



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

FECHA DE PRESENTACIÓN



TRADUCCIÓN DE UNA PATENTE EUROPEA QUE DESIGNA A ESPAÑA

Nº DE SOLICITUD PATENTE EUROPEA		Nº DE PUBLICACIÓN PATENTE EUROPEA CONCEDIDA	
97610056.0		869167	
TITULAR/ES	APELLIDOS O DENOMINACIÓN JURÍDICA		NOMBRE
Novozymes A/S			
DATOS DEL TITULAR/ES			
DOMICILIO			
LOCALIDAD 2880 Bagsvaerd			
PAIS RESIDENCIA Dinamarca		TELEFONO	
NACIONALIDAD Danesa		CÓDIGO NACIÓN DK	
REPRESENTANTE:			
Tesifonte-Enrique Tomás Gil			
con domicilio en:			
D'AGOSTINI ORGANIZZAZIONE S.L.			
C/San Telmo n° 7			
0302 Alicante			
TÍTULO DE LA INVENCIÓN (EN ESPAÑA)			
Reducción de los componentes que contienen fósforo en los aceites comestibles que comprenden una cantidad elevada de fósforo no hidratable mediante el uso de una fosfolipasa, una fosfolipasa de un hongo filamentoso que tiene una actividad de fosfolipasa A y/o B			
DE CONFORMIDAD CON LO DISPUESTO EN EL CAPÍTULO V DEL R.D. 2424/1986, DE 10 DE OCTUBRE SE PRESENTA LA TRADUCCIÓN DEL FASCÍCULO DE LA PATENTE EUROPEA ARRIBA MENCIONADA PARA QUE DICHA PATENTE SURTA EFECTOS EN ESPAÑA.			
RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN			
<input checked="" type="checkbox"/> PRIMERA PÁGINA FASCÍCULO PATENTE EUROPEA PUBLICADO POR LA OEP			
<input checked="" type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL FASCÍCULO			
<input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS (EN SU CASO)			
<input checked="" type="checkbox"/> AUTORIZACIÓN AL REPRESENTANTE			
<input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE LAS TASAS			
FIRMA DEL TITULAR/ES O REPRESENTANTE/S			
Tesifonte-Enrique Tomás Gil			
Agente Oficial n. 824/9			
Colegiado n. 646			

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0007678

92

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL: NOVOZYMES

NOMBRE:

REPRESENTANTE (Código): 0824 DÍGITO DE CONTROL 9 (4) ☐

EXPEDIENTE (modalidad, n.º expte.): EP 869167 ☐ DÍGITO DE CONTROL ☐


CÁTEDRA	AÑO CURSO	UNIDADES O TEMAS	CONCEPTO CATEGORÍA	PUNTAJE NOTA O PUNTAJE
ET03	2002		PUBLICACIÓN FASCÍCULO (89 pág).	887'65

A INGRESAR EUROS (En letra): OCHOCIENTOS OCHENTA Y SIETE CON SESENTA CINCO INTERES

INSTRUCCIONES:

- 0 Sólo se pagará una clave en cada impreso.
- 1 Este documento deberá cumplimentarse a máquina, o utilizando bolígrafo sobre superficie dura con letras mayúsculas. **No se admiten enmiendas ni tachaduras.**
- 2 Para cumplimentar las casillas Clave, Concepto e Importe ver información adjunta.
- 3 Unidades: utilizar esta casilla sólo en solicitudes de transmisión de derechos de cualquier modalidad, expedición de certificaciones y copias autorizadas, y prioridades, que conformen un único expediente.
- 4 Si su pago corresponde a una PATENTE EUROPEA, especifique en el recuadro "P o S" dependiendo de si el número de expediente que va a indicar es el de Publicación o Solicitud.
- 5 En caso de solicitud, en que no se conoce el n.º de expediente, escriba sólo la modalidad (ver códigos de modalidades).
- 6 Una vez validado por el Banco, el ejemplar de este impreso destinado a la OEPM, deberá adjuntarse a la correspondiente documentación en el momento de su presentación ante la misma, conservando en su poder el ejemplar del interesado para posibles reclamaciones frente a la Administración.
- 7 El pago podrá realizarse en la oficina bancaria de la Caixa situada en la OEPM o en cualquier sucursal de la citada entidad financiera en el territorio nacional, adjuntando la presente liquidación.
- 8 Para cualquier aclaración, puede consultar al teléfono 902 15 75 30

Nota: Datos protegidos según lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre

CLAVE PARA "La Caixa"	APLICACIÓN "PAT"	
REFERENCIA:	61001946417	909992100200161001946417
VALIDACIÓN MECÁNICA		
2002 2106 2100-2106-20021129-003452 IMPORTE *****887,65Eur ***COBRO***		
2002 61-0019464-17 EN EFECTIVO		

COPIA PARA LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS A ENTREGAR POR EL INTERESADO

Fórmulas de pago:

☒ Efectivo.

☐ Adeudo en cuenta. 2 1 0 0

☐ Cheque registrado. Entidad N.º cheque

- Indicar una única fórmula de pago.
- En caso de adeudo en cuenta, cumplimentar el Código de Cuenta Cliente completo.
- En caso de cheque registrado, cumplimentar la Entidad emisora y el número del mismo.

C/. Panamá, 1
28071 Madrid

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para reducir el contenido de componentes con fósforo en un aceite comestible que incluye una elevada cantidad de fósforo no hidratable, mediante el uso de una fosfolipasa.

- 5 Además, la presente invención se refiere a una enzima con actividad fosfolipasa, a una secuencia clonada de ADN que codifica la enzima con actividad fosfolipasa, a un método para producir la enzima y al uso de dicha enzima para varias aplicaciones industriales.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Desgomado enzimático de aceites comestibles que incluyen una cantidad relativamente alta de contenido de fósforo no hidratable:

- 15 Se conoce el uso de la fosfolipasa para el desgomado enzimático de un aceite comestible desgomado con agua (US 5.264.367, Metallgesellschaft, Röhm) para reducir el contenido de fósforo de dicho aceite comestible desgomado con agua.

No obstante, este proceso puede mejorarse, especialmente para realizar el desgomado enzimático de aceites comestibles que incluyen una alta cantidad de fósforo no hidratable (NHP) y/o cantidades relativamente altas de mucílago.

- 20 Consecuentemente, un objetivo de la invención es proporcionar un método para reducir el contenido de componentes con fósforo de dichos aceites, donde dicho método consta del uso de una fosfolipasa.

Una fosfolipasa de la invención

- 25 Fosfolípidos, como lecitina o fosfatidicolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y mediana (sn-2) y esterificados con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, puede ser esterificado para un aminoalcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de fosfolípidos. Pueden distinguirse diferentes tipos de actividad fosfolipasa, incluyendo fosfolipasas A₁ (PLA₁) y A₂ (PLA₂), las cuales hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y la lisofosfolipasa (o fosfolipasa B (PLB)), la cual puede hidrolizar el grupo acilo graso restante en
- 30 lisofosfolípido.

Esta invención se refiere i.a. a una fosfolipasa fúngica filamentosa que tiene la capacidad de hidrolizar uno y/o ambos grupos acilos grasos en un fosfolípido (es decir, presenta actividad PLA y/o PLB).

Enzimas fúngicas PLA y/o PLB caracterizadas previamente:

Numerosas referencias describen la caracterización de la fosfolipasas fúngicas. Con el objetivo obtener una perspectiva del estado de la técnica precedente más fácilmente, las referencias se han agrupado en dos secciones.

5 La primera sección trata las referencias que describen la identificación de las fosfolipasas fúngicas, las cuales no se cree actualmente que están relacionadas con la fosfolipasa fúngica de la presente invención. Estas referencias se incluyen principalmente con el objetivo de resumir el estado de la técnica dentro del campo de la caracterización de las fosfolipasas fúngicas.

10 La segunda sección trata las referencias que describen la caracterización de las fosfolipasas fúngicas, las cuales se cree que tienen relevancia en cuanto a las fosfolipasas fúngicas de la presente invención.

Primera sección

Se han encontrado enzimas con actividad fosfolipasa A y/o B en varias fuentes fúngicas, incluyendo *Penicillium notatum* (también conocido como *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem., 77, 1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem., 202, 783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5): 393-401 (1995)), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem., 49 (4), 1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem., 269, 19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (del antiguo nombre *Saccharomyces rosei*; Y. Kuwabara, Agric. Biol. Chem., 52 (10), 2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters, 124, 29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60 (7), 1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-zyne™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; Process Biochemistry 30(5): 393-401 (1995)) y *Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., Agric. Biol. Chem., 43 (3), 517-525, 1979).

Segunda sección:

La EP 575133 A2 describe el aislamiento y la caracterización de una fosfolipasa fúngica A1 obtenida a partir de *Aspergillus* y su uso para aplicaciones industriales.

30 No se describe ninguna información de la secuencia (ni ADN ni aminoácido) en la solicitud, ni ninguna estrategia o sugerencia para clonar cualquiera de las fosfolipasas de *Aspergillus* discutidas o indicadas en la solicitud.

Tsung-Che et al. (Phytopathological notes 58:1437-38 (1968)) describe brevemente la caracterización de una fosfolipasa de *Fusarium solani*.

35 La EP130064 describe una fracción aislada de un caldo de fermentación que presenta actividad lipasa obtenida de la cepa de *Fusarium oxysporum*, DSM 2672. Además, se describe su uso en las composiciones detergentes. No obstante, la EP 130.064 no describe esta fracción como exposición de cualquier actividad fosfolipasa.

La WO 96/13579 describe una lipasa obtenida de la cepa de *Fusarium culmorum*, CBS 513.94 que incluye su secuencia N-terminal.

No obstante, la WO 96/13579 no describe una enzima que presenta actividad fosfolipasa.

- 5 Se describe una secuencia de ADNc que codifica una lipasa de *Fusarium heterosporum* (*Cloning and nucleotide SEquence of cDNA encoding a lipase from Fusarium heterosporum*, J. Biochem. 116, 536-540, 1994). Se cree que esta secuencia actualmente es la secuencia de ADN más relacionada en comparación con una secuencia clonada de ADN de la invención (Véase sección "Comparación con la técnica
10 precedente" (véase abajo). No obstante, esta referencia no describe una enzima con actividad fosfolipasa.

- Se describe una secuencia de ADNc que codifica una fosfolipasa B de *Penicillium notatum* (Eur. J. Biochem 202:783-787, 1991). Sin embargo, esta secuencia clonada de ADN tiene una homología muy limitada a una secuencia de ADN de la invención (Véase
15 sección "Comparación con la técnica precedente" (véase abajo).

Aplicación industrial de las fosfolipasas:

- En la técnica se conocen varios usos de la fosfolipasas, como el uso de la fosfolipasas en, p. ej. el desgomado enzimático de un aceite desgomado con agua (US 5.264.367, Metallgesellschaft, Röhm); tratamiento del hidrolizado de almidón
20 (particularmente del almidón del trigo) para mejorar la filtrabilidad (EP 219.269, CPC International); como aditivo para la masa del pan para mejorar la elasticidad del mismo (US 4.567.046, Kyowa Hakko); y para la preparación de lisolectina con propiedades emulsionantes especiales.

- Actualmente, la fosfolipasa Lecitase® (Novo Nordisk A/S) se usa comercialmente
25 para el desgomado de aceites. Lecitase® es una enzima mamífera obtenida del páncreas de cerdo.

Es bien conocida la posibilidad de producir enzimas fúngicas recombinantemente con rendimientos aceptables industrial y económicamente, especialmente a partir de hongos filamentosos.

- 30 Consecuentemente, un objetivo de esta invención es proporcionar una fosfolipasa mejorada p. ej. para el uso en los procesos anteriormente descritos.

Además, un objetivo de la presente invención es describir unos procesos y métodos para la producción recombinante con rendimientos aceptables industrialmente de una fosfolipasa obtenida de un hongo filamentoso.

RESUMEN DE LA INVENCION

El desgomado de agua de aceites comestibles se realiza mediante extracción con agua. En dicho tratamiento, una parte de los fosfátidos se deja en el aceite. Dicha parte
5 está descrita por el término genérico "fosfátidos no hidratables" (NHP). En la producción de aceites, es esencial eliminar el contenido de NHP (US 5264367).

La presente invención proporciona un método para eliminar el contenido de NHP en un aceite que incluye una cantidad relativamente alta de NHP.

En consecuencia, en un primer aspecto la invención se refiere a un método para
10 reducir el contenido de los componentes con fósforo en un aceite comestible que tiene un contenido de fósforo no hidratable de al menos 50 partes por millón medido por,

- i) tratamiento previo del aceite comestible, a 60°C, mediante la adición de una solución que incluye monohidrato de ácido cítrico en agua (agua añadida vs. aceite equivale al 4,8% peso/peso; [ácido cítrico] en fase de agua = 106 mM, en
15 emulsión de agua/aceite = 4,6 mM) durante 30 minutos;
- ii) transferencia de 10 ml del agua tratada previamente en emulsión de aceite a un tubo;
- iii) calentamiento de la emulsión al baño maría durante 30 minutos;
- iv) centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos,
- 20 v) transferencia de aproximadamente 8 ml de la fase superior (de aceite) a un tubo nuevo y asentamiento durante 24 horas; y
- vi) posteriormente, extracción de 2 gr. de la fase clara superior para la medición del contenido de fósforo no hidratable (partes por millón) en el aceite comestible;

y donde dicho método consta del,
25 contacto de dicho aceite a un pH de 1,5-8 con una solución acuosa de una fosfolipasa A₁, una fosfolipasa A₂ o una fosfolipasa B, cuya solución está emulsionada en el aceite hasta que el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 partes por millón y posterior separación de la fase acuosa del aceite tratado.

En otro aspecto, la invención se refiere a una nueva fosfolipasa clonada.

30 Nuevas investigaciones de la actividad lipasa encontrada en *Fusarium oxysporum*, DSM 2672 (y descrita en EP 130.064) revelan que la fracción aislada consta de diferentes componentes que tienen actividad lipasa, de los cuales uno presentaba actividad fosfolipasa.

A pesar de varias dificultades técnicas (véase abajo), los presentes inventores
35 han sido capaz de clonar una enzima que presenta actividad fosfolipasa A de una cepa del género *Fusarium*, más específicamente *Fusarium oxysporum*.

Esta es la primera vez que una fosfolipasa A fúngica filamentosa ha sido clonada y, en consecuencia, la presente invención proporciona una secuencia clonada de ADN que codifica una enzima de la fosfolipasa A fúngica filamentosa.

En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfolipasa A, donde la secuencia de ADN se obtiene a partir de un hongo filamentoso.

Se describe una secuencia de ADN que codifica una fosfolipasa B de *Penicillium notatum* en Eur. J. Biochem 202:783-787, 1991.

No obstante, esta secuencia de ADN muestra solamente una identidad de ADN muy limitada del 39% a la secuencia de ADN de la presente invención (SEC ID No 1 23-1060) y, además, una característica fisiológica como masa molecular varía considerablemente entre dicho PLB de *P. notatum* (66 kDa) y una fosfolipasa de la invención (29 ± 10 kDa (véase abajo).

Además, una comparación con el nucleótido de la técnica precedente y secuencias de aminoácidos demuestran que la secuencia de ADN y/o la secuencia de aminoácidos codificada correspondiente de la invención tiene sólo una pequeña homología en comparación con cualquier secuencias de ADN y/o de aminoácidos de la técnica precedente (véase abajo).

En consecuencia, actualmente se cree que la información de la secuencia de ADN proporcionada en la presente solicitud será altamente valiosa para, por ejemplo, clonar otra fosfolipasa relacionada/homóloga que codifica secuencias de ADN, puesto que una sonda de hibridación específica y/o cebadores PCR pueden ahora fácilmente construirse basándose en dicha secuencia de ADN de la invención.

Además, actualmente se cree que es posible clonar una fosfolipasa A relacionada/homóloga y/o fosfolipasa B que codifica secuencias de ADN basada en la información de la secuencia proporcionada por la presente solicitud.

En consecuencia, en otro aspecto la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN que codifica una enzima que presenta actividad fosfolipasa A y/o fosfolipasa B, cuya secuencia de ADN está seleccionada del grupo que incluye:

- 30 (a) la fosfolipasa A que codifica parte de la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 23-1063 en la secuencia ID NO 1, más preferiblemente en las posiciones 113-1063 en la secuencia ID No 1, o incluso más preferiblemente en las posiciones 113-929 en la secuencia ID No 1, o
- 35 su cadena complementaria;
- (c) una secuencia de ADN que es homóloga al menos en un 70% con dichas secuencias de ADN definidas en (a) o (b);

- (d) una secuencia de ADN definida en (a) o (b), la cual codifica un polipéptido que presenta actividad fosfolipasa y es homóloga al menos en un 70% con la secuencia polipeptídica mostrada en las posiciones 31-346 de la secuencia ID No 2, o más preferiblemente homóloga al menos en un 70% con la secuencia polipeptídica mostrada en las posiciones 31-303 de la secuencia ID No 2;
- (e) una secuencia de ADN que se hibridiza con una sonda de ADN de doble cadena que incluye la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 23-1063 en la secuencia ID No 1 con rigor bajo;
- (f) una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido que tiene las mismas secuencias de aminoácidos en los residuos de las posiciones 1 a 346, 31 a 303 o 31 a 303 de la secuencia ID No 2, o las secuencias de aminoácidos incluidas por cualquiera de las secuencias de ADN de (e); y
- (g) una secuencia de ADN que es un fragmento de las secuencias de ADN especificadas en (a), (b), (c), (d), (e), o (f).

Además, una fosfolipasa de la invención ha sido intensivamente caracterizada y se ha descubierto que tiene actividad fosfolipasa con un pH bajo; esta propiedad es muy adecuada para el uso en el desgomado del aceite. La fosfolipasa no es un enlace de membrana, el cual es adecuado para la producción comercial y purificación.

En consecuencia, en otro aspecto la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa A, cuyo polipéptido se obtiene de una cepa del género *Fusarium* y tiene

- i) actividad PLA en el margen de pH 3-10, medido a 40°C;
- ii) una masa molecular de 29 ± 10 kDa, como se determina por sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacríamida (SDS-PAGE);
- iii) un punto isoelectrónico (pI) en el margen 4,5-8;
- iv) una temperatura óptima para la actividad fosfolipasa en el margen entre 25-55°C, medido con lecitina como sustrato con un pH 5; y/o
- v) un pH óptimo para una actividad fosfolipasa en el margen de pH entre 6-12, medido con lecitina como sustrato a 37°C.

Se muestra una secuencia de aminoácidos deducida de una fosfolipasa aislada de la invención en la secuencia ID No 2.

Se ha determinado la secuencia N-terminal de aminoácidos de una fosfolipasa madura, secretada y aislada. Dicha secuencia N-terminal demuestra que la parte madura de una fosfolipasa de la invención, la cual tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia ID No 2, comienza en el aminoácido No 31 en la secuencia ID No 2. Véase el ejemplo para más detalle (véase abajo).

Además, se ha determinado la secuencia C-terminal de una fosfolipasa activa y secretada de la invención, la cual tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia ID No 2. Dicha fosfolipasa C-terminal determinada fue expresada recombinantemente en la cepa fúngica filamentosa *Aspergillus oryzae*. Véase el ejemplo 5 para más referencia.

Estos resultados muestran que la enzima fue procesada en C-terminal durante la expresión de *A. oryzae*, y los resultados indican que el Ser303 en la secuencia ID No 2 es el residuo C-terminal más posible en la enzima activa y madura expresada. No obstante, está previsto que pueda incluso tener lugar un tratamiento adicional de C-terminal (dando un fragmento de dichas secuencias), y teniendo todavía una enzima activa y madura expresada.

En consecuencia, en otro aspecto la invención se refiere a una enzima aislada que presenta actividad fosfolipasa A y/o B siendo seleccionada del grupo que incluye:

- (a) un polipéptido codificado por la fosfolipasa A y/o B que codifica parte de la enzima de la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en las posiciones 31-346 de la secuencia ID No 2;
- (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la posición 31-303 de la secuencia ID No 2;
- (d) un análogo del polipéptido definido en (a), (b) o (c) cuyo análogo es homólogo en al menos un 70% con dicho polipéptido; y
- (e) un fragmento de (a), (b) (c) o (d).

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un vector recombinante de expresión, el cual facilita la producción heteróloga recombinante de una enzima de la invención. De ese modo puede conseguirse una composición de la fosfolipasas altamente purificada, caracterizada por estar libre de impurezas homólogas. Esto resulta de una gran ventaja para numerosas aplicaciones industriales.

La presente invención demuestra experimentalmente (véase abajo) que una fosfolipasa obtenida de una cepa de *Fusarium culmorum* y *Fusarium oxysporum* ha mejorado sus propiedades para el uso en aplicaciones industriales relevantes. Está previsto que las fosfolipasas obtenidas de una cepa del género *Fusarium* mejorará sus propiedades relevantes para el uso en aplicaciones industriales relevantes.

En consecuencia, en otro aspecto la invención incluso se refiere al uso de una fosfolipasa obtenida de una cepa del género *Fusarium*, como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o en particular una cepa de *Fusarium oxysporum*, en un

proceso que comprende el tratamiento de un fosfolípido o lisofosfolípido con fosfolipasa para hidrolizar los grupos acilos grasos.

Finalmente, la invención se refiere a un cultivo biológico aislado y substancialmente puro de la cepa *Escherichia coli* DSM No.11299 que alberga una secuencia de ADN que codifica una fosfolipasa (la parte que codifica la fosfolipasa de la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2.0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299) obtenida de una cepa fúngica filamentosa *Fusarium oxysporum*, o cualquier mutante de dicha cepa *E.coli* que ha retenido la capacidad de codificación de la fosfolipasa.

Comparación de la homología secuencial con la técnica precedente

Se realizó una búsqueda de homología con la fosfolipasa de la invención contra el nucleótido y bases de datos de proteínas. La búsqueda de homología muestra que la secuencia más relacionada conocida era una lipasa de *Fusarium heterosporum* (en la figura 1 se ilustra una alineación de aminoácidos).

La secuencia de ADN de la invención (SEC ID No 1 23-1060) que codifica la fosfolipasa muestra sólo el 62% de homología del ADN con la secuencia de la lipasa conocida de *Fusarium heterosporum* (referencia S77816 de la base de datos Genbank), y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la fosfolipasa de la invención (SEC ID No 2) muestra sólo el 60% de homología con una secuencia de aminoácidos deducida basada en la secuencia de ADN conocida anteriormente mencionada (véase figura 1).

Esto demuestra que la secuencia de ADN y/o la secuencia de aminoácidos de una fosfolipasa de la invención es de hecho diferente de cualquier secuencia(s) conocida(s) de ADN y/o de aminoácidos.

Se describe una secuencia de ADNc que codifica una fosfolipasa B de *Penicillium notatum* (Eur. J. Biochem 202:783-787, 1991). No obstante, esta secuencia de ADN (referencia X60348 de la base de datos Genbank) muestra solamente una identidad del ADN muy limitada 39%, para la secuencia de ADN de la presente invención (SEC ID No 1, 23-1060), y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la fosfolipasa de la invención (SEC ID No 2) muestra solamente el 20% de identidad para una secuencia de aminoácidos deducida basada en la secuencia conocida de ADN de PLB anteriormente mencionada. El cálculo de la homología se realizó como se describe más adelante en esta especificación.

DIBUJOS

Figura 1: Alineación de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID No 2 con una secuencia de lipasas de la técnica precedente de *Fusarium heterosporum*.

Figura 2: Comparación de la capacidad de desgomado enzimático de Lecitase™ y una fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* según la invención.

DEFINICIONES

5. Antes de debatir esta invención con más detalle, se definirán los siguientes términos.

"Una secuencia clonada de ADN": El término "secuencia clonada de ADN" se refiere a una secuencia de ADN clonada según los procedimientos de clonación estándar utilizados en la ingeniería genética para recolocar un segmento de ADN desde su ubicación natural a un sitio diferente donde se reproducirá. El proceso de clonación implica la escisión y aislamiento del segmento de ADN deseado, inserción de la parte de ADN en la molécula del vector e incorporación del vector recombinante en una célula donde se duplicarán múltiples copias o clones del segmento de ADN.

15. La "secuencia clonada de DNA " de la invención puede de forma alternativa denominarse "constructo de ADN" o " polinucleótido clonado que tiene una secuencia de DNA" "secuencia de DNA aislada".

"Obtenida de": A los efectos de la presente invención, el término "obtenida de", como se utiliza en este caso en conexión con una fuente microbiana específica, significa que la enzima y consecuentemente la secuencia de ADN que codifica dicha enzima se produce por la fuente específica o por una célula en la que se ha insertado un gen de la fuente.

"Un polipéptido aislado": Tal como se define en este caso, el término "un polipéptido aislado" o "fosfolipasa aislada", como se usa en referencia con la fosfolipasa de la invención, es una fosfolipasa o parte de la fosfolipasa la cual está esencialmente libre de otros polipéptidos no fosfolipasas , p. ej. al menos un 20% puro, preferiblemente al menos un 40% puro, más preferiblemente un 60% puro, incluso más preferiblemente un 80% puro, lo más preferiblemente un 90% puro e incluso lo más preferiblemente un 95% puro, como se determina por el sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacríamida (SDS-PAGE).

30. Cuando el polipéptido aislado es al menos puro en un 60%, puede utilizarse el término "un polipéptido muy aislado". El "polipéptido aislado" puede de forma alternativa denominarse "polipéptido purificado".

"Impurezas homólogas": Como se utiliza en este caso, el término "impurezas homólogas" significa cualquier impureza (p. ej. otro polipéptido que la enzima de la invención) que se origina de la célula homóloga de la cual se obtiene originariamente la enzima de la invención. En la presente invención la célula homóloga puede p. ej. ser una cepa de *Fusarium oxysporum*.

"Parte que codifica fosfolipasas": Como se utiliza en este caso, el término "parte que codifica fosfolipasas" utilizado en conexión con una secuencia de ADN significa la región de la secuencia de ADN que corresponde con la región traducida en una secuencia polipeptídica.

5 En la secuencia de ADN mostrada en la secuencia ID No 1, es la región entre el primer codón de iniciación "ATG" (codón "AUG" en ARNm) y el codón de terminación siguiente ("TAA", "TAG" o "TGA").

El polipéptido traducido puede adicionalmente, además de la secuencia madura que presenta actividad fosfolipasa, comprender una señal N-terminal y/o una secuencia propeptídica. La secuencia de la señal generalmente guía la secreción del polipéptido y el propéptido guía generalmente el pliegue del polipéptido. Para más información véase
10 Egnell, P. et al. Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992) o Stryer, L., "Biochemistry" W.H., Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

"Modificación(es) de una secuencia de ADN y/o secuencia de aminoácidos" El
15 término "modificación(es)" usado en conexión con modificación(es) de una secuencia de ADN y/o de aminoácidos como se discute en la presente, está definido para incluir una modificación química así como una manipulación genética. La(s) modificación(es) puede(n) ser sustitución, supresión y/o inserción dentro o en el amino ácido(s) de interés.

"Fosfolipasa A": El término "Fosfolipasa A" usado aquí en conexión con una
20 enzima de la invención se destina para cubrir una enzima con actividad fosfolipasa A1 y/o Fosfolipasa A2.

La fosfolipasa A1 está definida según la clasificación EC estándar de la enzima como EC 3.1.1.32.

Nombre oficial: Fosfolipasa A1 (PLA1).

25 Reacción catalizada:

fosfatidicolina + H₂O <>

2-acilglicerofosfocolina + un anión de ácido graso

Comentario(s):

tiene una especificidad mucho más amplia que la ec 3.1.1.4.

30 La fosfolipasa A2 está definida según la clasificación EC estándar de la enzima como EC 3.1.1.4

Nombre oficial: fosfolipasa A2 (PLA2).

Nombre(s) alternativo(s): fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa.

lecitinasas; fosfatidasas; o fosfatidolipasas.

35 Reacción catalizada:

fosfatidicolina + h₂o <>

1-acilglicerofosfocolina + un anión de ácido graso

comentario(s): también actúa sobre fosfatidiletanolamina, plasmalógeno de colina y fosfátidos, eliminando el ácido graso retenido en la 2- posición.

"**Fosfolipasa B**": La fosfolipasa B está definida según la clasificación EC estándar de la enzima como EC 3.1.1.5.

5 Nombre oficial: lisofosfolipasa.

Nombre(s) alternativo(s): lecitinasa b; lisolecitinasa; fosfolipasa b; o plb.

Reacción catalizada:

2-lisofosfatidilcolina + h(2)o <>

glicerofosfocolina + un anión de ácido graso

10 "**Actividad fosfolipasa**": El término "actividad fosfolipasa" o "que tiene/presenta actividad fosfolipasa" como se utiliza en este caso en conexión con una enzima de la invención, se destina para especificar una enzima que tiene al menos la cantidad de actividad fosfolipasa (que sea PLA o PLB) definida experimentalmente a continuación.

En consecuencia, una enzima que presenta actividad fosfolipasa se define aquí
15 como una enzima que en el "ensayo fosfolipásico monomolecular" mostrado en el ejemplo 6 de la presente (véase abajo) tiene una actividad fosfolipasa de al menos 0,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos 0,40 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos 0,75 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos 1,0 nmol/min, dosis enzimática:
20 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos 1,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; e incluso más preferiblemente al menos 1,5 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C.

Actualmente se cree que sólo las enzimas que tienen dicha actividad fosfolipasa
significante son de importancia industrial, por ejemplo para el uso en el desgomado (US
25 5.264.367).

"**Una lipasa con una actividad fosfolipasa lateral**": El término "lipasa con actividad fosfolipasa lateral" se define, en consecuencia, como una lipasa con una actividad fosfolipasa lateral, donde la actividad fosfolipasa lateral en el "ensayo fosfolipásico monomolecular" mostrado en el ejemplo 6 es menor que las figuras mencionadas
30 anteriormente.

Varias lipasas tienen dicha actividad fosfolipasa lateral. En el ejemplo 6 de la presente (véase abajo), se muestran algunas lipasas que tienen una actividad fosfolipasa lateral.

"**Un aceite crudo**": Un aceite crudo (también llamado aceite no desgomado) puede
35 ser un aceite prensado o extraído o una mezcla derivada de p. ej. semilla de colza, soja o girasol. El contenido de fosfátidos en un aceite crudo puede variar de 0,5-3% peso/peso correspondiente a un contenido de fósforo en el margen de 200-1200 partes por millón,

más preferiblemente en el margen de 250-1200 partes por millón. Aparte de los fosfátidos, el aceite crudo también contiene pequeñas concentraciones de carbohidratos, compuestos de azúcar y ácidos metálicos/fosfátidos complejos de Ca, Mg y Fe.

5 **"Un aceite semicrudo"**: Cualquier aceite que no es un aceite crudo, pero que tiene un contenido de fosfátidos de 250 partes por millón, más preferiblemente 500 partes por millón. Dicho aceite podría p. ej. conseguirse sometiendo un aceite crudo a un proceso similar al proceso de "aceite desgomado con agua" descrito a continuación.

10 **"Un aceite desgomado con agua"**: Normalmente se obtiene un aceite desgomado con agua mediante la mezcla de 1-3% peso/peso de agua caliente con aceite crudo caliente (60-90°C). Los períodos normales de tratamiento son de 30-60 minutos. La fase del desgomado con agua remueve los fosfátidos y gomas mucilaginosas, que se vuelven insolubles en el aceite cuando se hidratan. Las gomas y fosfátidos hidratados pueden separarse del aceite mediante asentamiento, filtración o centrifugado, el centrifugado es la práctica más predominante.

15 El objeto esencial en dicho proceso del desgomado con agua es separar los fosfátidos hidratados del aceite. La mezcla de agua caliente en el aceite, descrita anteriormente, debería entenderse aproximadamente como una mezcla de una solución acuosa en el aceite según los procedimientos estándar de desgomado con agua en la técnica.

20 De forma alternativa, el proceso aquí denominado "aceite desgomado con agua" puede denominarse "refinación húmeda para eliminar mucílago"(véase US 5.264.367).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Un método para el desgomado enzimático de un aceite comestible que incluye una cantidad alta de fosfátidos/fosfolípidos no hidratable

Para la presente invención la cantidad de fósforo no hidratable en un aceite comestible está medido mediante,

- 30 i) tratamiento previo del aceite comestible, a 60°C, mediante la adición de una solución que incluye monohidrato de ácido cítrico en agua (agua añadida vs. aceite equivale a 4,8% peso/peso; [ácido cítrico] en fase acuosa = 106 mM, en una emulsión de agua/aceite = 4,6 mM) durante 30 minutos;
- ii) transferencia de 10 ml del agua tratada previamente en una emulsión de aceite a un tubo;
- iii) calentamiento de la emulsión al baño maría durante 30 minutos;
- 35 iv) centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos,
- v) transferencia de aproximadamente 8 ml de la fase superior (de aceite) a un tubo nuevo y asentamiento durante 24 horas;

vi) tras del asentamiento, extracción de 2 g de la fase clara superior para la medición del contenido de fósforo no hidratable (partes por millón) en el aceite comestible.

Para más detalles, a continuación se hace referencia a los ejemplos.

5 Como se ilustra en los ejemplos de la presente, la composición de fosfolípidos (fosfolípidos hidratables vs. no hidratables) de aceites comestible diferentes varía considerablemente. Consecuentemente, el nivel de los fosfolípidos restante en diferentes aceites desgomados de agua variará sobre una amplia gama (p. ej. alrededor de 30 partes por millón a 200 partes por millón).

10 Para el desgomado enzimático, la dosificación óptima de enzimas depende de la cantidad de fosfátidos no hidratables presente después del desgomado con agua o pretratamiento con ácido cítrico/agua tal como se ha definido anteriormente.

Además, cuanto más alta es la cantidad de fosfátidos no hidratables presente en el aceite, más eficaz es el método de desgomado enzimático.

15 La presente invención proporciona un método para eliminar el contenido de NHP del aceite que incluye una cantidad relativamente alta de NHP.

Preferiblemente, el aceite comestible consta de un contenido de fósforo no hidratable de al menos 60 partes por millón, más preferiblemente al menos 100 partes por millón e incluso más preferiblemente de al menos 200 partes por millón.

20 Más preferiblemente, el aceite comestible consta de un contenido de fósforo no hidratable en el margen de 60-500 partes por millón, más preferiblemente en el margen de 100-500 partes por millón e incluso más preferiblemente en el margen de 200-500 partes por millón.

25 Un aceite comestible definido como que tiene una cantidad relativamente alta de fósforo no hidratable, según esta descripción, puede ser un aceite desgomado con agua o más preferiblemente un aceite crudo o un aceite semicrudo.

30 En consecuencia, una forma de realización de la invención se refiere a un método según el primer aspecto de la invención, donde dicho aceite comestible es un aceite crudo, caracterizado por el hecho de que dicho aceite crudo comestible, antes de llevar a cabo el método de la invención, es un aceite con un contenido de fósforo superior a 250 partes por millón, cuyo aceite no ha sido desgomado con agua (el desgomado con agua consta de la mezcla de agua caliente con un aceite crudo seguido por la eliminación de fosfátidos que se vuelven insolubles en el aceite cuando se hidratan) antes de llevar a cabo el método de la invención.

35 Preferiblemente, dicho aceite comestible crudo tiene, antes de llevar a cabo dicho método de la invención, un contenido de fósforo superior a 350 partes por millón, más

preferiblemente superior a 400 partes por millón, incluso más preferiblemente superior a 500 partes por millón y más preferiblemente superior a 600 partes por millón.

Además, dicho aceite comestible crudo preferiblemente tiene, antes de llevar a cabo dicho método de la invención, un contenido de fósforo en el margen de 250-1500 partes por millón, más preferiblemente en el margen de 350-1500 partes por millón, incluso más preferiblemente en el margen de 500-1500 partes por millón y más preferiblemente en el margen de 500-1500 partes por millón.

El método del desgomado enzimático de un aceite comestible crudo según la invención es de ventaja sobre el método de la técnica precedente para el desgomado enzimático de aceites comestibles desgomados con agua (US 5.264.367), puesto que un método de desgomado enzimático directo para el tratamiento de un aceite crudo, según la invención, eliminará la fase previa del desgomado con agua del aceite.

Esto ahorra tiempo y dinero. Normalmente se obtiene un aceite desgomado con agua mediante la mezcla de agua caliente con aceite crudo caliente (60-90°C) durante normalmente 30-60 minutos. Por el contrario, el proceso completo de desgomado enzimático de aceites crudos según la invención puede realizarse en menos de 1 hora, con tratamiento enzimático real durante alrededor de 25 minutos. Véanse los ejemplos para más detalles.

Además, un aceite comestible definido como que tiene una cantidad relativamente alta de un fósforo no hidratable, según esta descripción, puede ser un aceite semicrudo.

En consecuencia, una forma de realización de la invención se refiere a un método según el primer aspecto de la invención, donde dicho aceite comestible es un aceite comestible semicrudo, caracterizado por el hecho de que dicho aceite comestible semicrudo, antes de llevar a cabo el método de la invención, tiene un contenido de fósforo superior a 500 partes por millón (ppm), y donde dicho aceite ha sido desgomado con agua antes de llevar a cabo el método de la invención.

Preferiblemente, dicho aceite comestible semicrudo es un aceite que, antes de llevar a cabo dicho método, tiene un contenido de fósforo superior a 600 partes por millón, más preferiblemente superior a 750 partes por millón.

En general, el desgomado con agua de un aceite comestible reducirá los contenidos de fósforo del aceite a un nivel inferior a 500 ppm.

En consecuencia, un aceite semicrudo como se describe en este caso puede p. ej. haber sido sólo parcialmente desgomado con agua antes de llevar a cabo un método para reducir el nivel de componentes con fósforo de un aceite comestible según la invención.

El término "desgomado parcialmente con agua" denota que el procedimiento de desgomado con agua del aceite ha sido sólo un proceso parcial/corto en comparación con el procedimiento de desgomado con agua estándar.

5 Un proceso "parcialmente desgomado con agua" puede realizarse mezclando sólo un 0,5% de agua caliente en el aceite (el estándar es 1-3% de agua caliente. Véase sección "Definiciones") o reduciendo el período de tratamiento a 10 minutos (el estándar es 30-60 minutos).

De forma alternativa, un aceite semicrudo tal como se define aquí, puede ser una mezcla de un aceite crudo y un aceite semicrudo.

10 Una forma de realización de la invención se refiere a un método según cualquiera del primer aspecto de la invención, la cual comprende las fases siguientes:

- i) ajuste de la temperatura del aceite comestible a una temperatura entre 25°C-70°C;
- 15 ii) tratamiento previo del aceite comestible a la anterior temperatura ajustada mediante la adición de un 0,5-6% (por peso relativo al aceite) de una solución acuosa que incluye al menos el 85% de agua durante 5-120 minutos, donde dicho pretratamiento no está seguido por la extracción de mucílago hidratado y contenido de fósforo en el aceite;
- 20 iii) ajuste del pH de la emulsión de agua/aceite a un pH entre 1,5-8 (p. ej. mediante la adición de una cantidad adecuada de una solución de NaOH);
- iv) contacto de la emulsión agua/aceite con una solución acuosa de una fosfolipasa (a una temperatura (+/- 5°C) ajustada según la fase i), cuya fosfolipasa se emulsiona en el aceite hasta que el contenido fosfórico del aceite se reduce a menos de 11 ppm;
- 25 v) separación de la fase acuosa del aceite tratado.

La temperatura del aceite comestible en la fase i) se ajusta preferiblemente a una temperatura que es la temperatura óptima de la actividad fosfolipasa de la enzima usada en el método.

30 Para la fosfolipasa comercialmente disponible Lecitase™ (Novo Nordisk A/S), ésta es de alrededor 60°C, y para una fosfolipasa de la invención obtenida a partir de *Fusarium* del género fúngico filamentoso, es de alrededor 45°C. Véanse los ejemplos para más detalles en relación a esta cuestión.

Está previsto que una mayoría de la fosfolipasas fúngicas filamentosas tendrán una temperatura óptima de alrededor 35-50°C.

35 En consecuencia, una forma de realización de la invención se refiere al método descrito anteriormente, donde la temperatura del aceite comestible en la fase i) está

ajustada a una temperatura entre 35°C-50°C y la fosfolipasa usada en la fase iv) se obtiene de una cepa fúngica filamentosa.

En la fase ii) del método anterior, el aceite comestible es previamente tratado en la temperatura ajustada (fase i) mediante la adición de un 0,5-6% (por peso relativo al
5 aceite) de una solución acuosa que incluye al menos el 85% de agua durante 5-120 minutos y donde dicho pretratamiento no es seguido por la extracción del contenido de fósforo y mucílago hidratado en el aceite.

Este paso es un paso del pretratamiento estándar en el desgomado enzimático de aceites comestibles (US 5.264.367; US 5.558.781). El propósito de la fase ii) es hidratar
10 los componentes hidratables/hidrofílicos (como el contenido de fósforo hidratable) en el aceite comestible, el cual cuando se hidrata se vuelve insoluble en el aceite.

No obstante, esta fase es diferente de lo que se denomina "desgomado con agua de un aceite comestible" en el presente contexto. Una diferencia importante es que dicha fase de pretratamiento no elimina los fosfátidos y mucílago hidratados del aceite. La
15 extracción de dicho contenido hidratado del aceite es el objetivo principal del desgomado con agua de los aceites comestibles.

En consecuencia, cuando la fosfolipasa contacta con el aceite en la fase iv) anterior, el aceite todavía consta de dichos fosfátidos y mucílago hidratados.

En otras palabras, si el aceite comestible es un aceite comestible desgomado sin
20 agua, el método anteriormente mencionado describe un método de desgomado enzimático simplificado, el cual no elimina los fosfátidos y mucílago hidratados del aceite antes de contactar con la fosfolipasa.

Preferiblemente, la solución acuosa que incluye al menos un 85% de agua (fase ii anterior) consta adicionalmente de ácido cítrico. Preferiblemente, hay entre un 1-15%
25 (peso/peso) de ácido cítrico en dicha solución acuosa, más preferiblemente hay entre un 3-11% (peso/peso) de ácido cítrico en dicha solución acuosa.

Preferiblemente, el periodo de tiempo en la fase ii) es de 15-50 minutos y más preferiblemente de 15-30 minutos.

Para más detalles en relación a dicho pretratamiento en la fase ii) anterior, se
30 hace referencia a unos ejemplos.

En la fase iii) anterior el pH de la emulsión de agua/aceite se ajusta a un pH de 1,5-8 (p. ej. mediante la adición de una cantidad adecuada de una solución de NaOH). Esto se hace con el objetivo de ajustar el valor de pH del aceite antes de que fosfolipasa contacte con el aceite en la fase iv). En general, el valor de pH óptimo real dependerá de
35 la enzima real usada para contactar el aceite en la fase iv). Para más detalles en relación a esta cuestión, se hace referencia a los ejemplos.

En general se prefiere, según el primer aspecto y sus formas de realización de la invención, que el contacto de dicho aceite con una solución acuosa que incluye una fosfolipasa se realice en un pH de 1,5-6, más preferiblemente en un pH de 3-6.

El valor de pH en la agua en la emulsión del aceite se mide tomando 2 ml de agua de la emulsión del aceite y mezclándolos con 2 ml de agua. Tras la separación de la fase, la capa de aceite superior resultante tiene que ser pipetada y el pH medido en la fase acuosa. Las medidas son transformadas en valores "reales" de pH por la fórmula siguiente $pH_{real} = pH_{medido} - 0,38$. Para más detalles se hace referencia a unos ejemplos.

Preferiblemente, en un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, la cantidad de una fosfolipasa que es emulsionada en el aceite está en el margen de 0,1-15 mg de enzima (sustancia seca) / kg de aceite, más preferiblemente 0,25-5 mg de enzima (sustancia seca) / kg de aceite, e incluso más preferiblemente 0,25-2,5 mg de enzima (sustancia seca) / kg de aceite.

En general, resulta de ventaja optimizar tanto la cantidad de la fosfolipasa usada como el tiempo usado para el desgomado enzimático de un aceite comestible para obtener un contenido de fósforo inferior a 11 ppm. La dosis de enzima óptima real y el período de tiempo, i.e., dependerá de la fosfolipasa real usada. Para más detalles en relación a la optimización de dosificación de enzimas y período de tiempo del método, se hace referencia a unos ejemplos.

Preferiblemente, en un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 ppm (partes por millón) tras el contacto de dicho aceite con 0,5-6 mg de la fosfolipasa (sustancia seca) / kg de aceite, y donde la fosfolipasa está en contacto con dicho aceite durante un período de tiempo de 1-6 horas, más preferiblemente el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 ppm tras el contacto de dicho aceite con entre 0,25-2,5 mg de la fosfolipasa (sustancia seca) / kg de aceite, y donde la fosfolipasa está en contacto con dicho aceite durante un período de tiempo de 15 minutos a 2 horas.

Véanse los ejemplos para más detalles en relación a la identificación de temperaturas óptimas para fosfolipasas individuales.

Preferiblemente, en todos los aspectos y formas de realización de un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 5 ppm.

El contenido de fósforo en el aceite se mide como partes por millón (ppm) en la fase de aceite del agua presente en la emulsión de aceite. El análisis del contenido de fósforo se realiza según el procedimiento 2.421 en "Standard Methods for the Analysis of

Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)". Para más detalles se hace referencia a unos ejemplos.

Una forma de realización de la invención se refiere a un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, donde
5 la fosfolipasa se obtiene de un especie mamífera, en particular donde la fosfolipasa se obtiene de un páncreas en dicha especie mamífera, y más preferiblemente donde la fosfolipasa se obtiene de un páncreas de cerdo.

Preferiblemente, en un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, la fosfolipasa se obtiene de un
10 microorganismo, preferiblemente un hongo filamentoso, una levadura o una bacteria.

Preferiblemente, cuando dicho hongo filamentoso anteriormente mencionado es una especie dentro del género *Fusarium*, las cepas preferidas son cepas de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o en particular de *F. oxysporum*.

Además, cuando dicho hongo filamentoso anteriormente mencionado es una
15 especie dentro del género *Aspergillus*, las cepas preferidas son las cepas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o en particular de *Aspergillus oryzae*.

Además, en un método para reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible según la invención, el aceite comestible es preferiblemente un aceite
20 de soja, aceite de semilla de girasol o, más preferiblemente, un aceite de semilla de colza.

Caracterización de la fosfolipasa obtenida de *Fusarium oxysporum*.

Se ha caracterizado intensivamente una fosfolipasa de la invención obtenida de
25 *Fusarium oxysporum*.

En consecuencia, un aspecto de la invención es preferiblemente una Fosfolipasa A aislada que se obtiene de una cepa del género *Fusarium* y tiene actividad fosfolipasa A en el margen de pH 3-10 medido a 40°C, más preferiblemente que tiene una actividad fosfolipasa A en el margen de pH 3-7 medido a 40°C, más preferiblemente que tiene una
30 actividad fosfolipasa A en el margen de pH 3,5-6 medido a 40°C, e incluso más preferiblemente que tiene una actividad fosfolipasa A en el margen de pH 4,5-5,5 medido a 40°C.

La actividad fosfolipasa A fue determinada con lecitina de soja como un ensayo de las bases de prueba del sustrato de NEFA), o en un tampón que incluye 2% Lecitina,
35 2% Tritón X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Véanse los ejemplos para más detalles.

En otra forma de realización de la invención, una Fosfolipasa A aislada, la cual se obtiene de una cepa del género *Fusarium*, es preferiblemente una que tiene una masa

molecular de 29 ± 10 kDa, más preferiblemente una masa molecular de 29 ± 5 kDa, incluso más preferiblemente una masa molecular de 29 ± 3 kDa y más preferiblemente una masa molecular de 29 ± 2 kDa.

La masa molecular se mide por electroforesis SDS-PAGE como se describe con más detalle en la sección "Materiales y Métodos" (véase abajo).

En otra forma de realización de la invención, una Fosfolipasa A aislada, la cual se obtiene de una cepa del género *Fusarium*, es preferiblemente una que tiene un punto isoeléctrico (pI) en el margen 4,5-8, más preferiblemente un punto isoeléctrico (pI) en el margen 5-7,5, e incluso más preferiblemente un punto isoeléctrico (pI) en el margen 5,5-7,5.

El punto Isoeléctrico (pI) fue determinado usando placas Ampholine PAGE de Pharmacia. Véase el ejemplo para más detalles, (véase abajo).

En otra forma de realización de la invención, una Fosfolipasa A aislada, la cual se obtiene de una cepa del género *Fusarium*, es preferiblemente una que tiene una temperatura óptima para una actividad fosfolipasa en el margen entre 25-55°C, medida con lecitina como sustrato con pH 5; más preferiblemente en el margen de 30-50°C, medida con lecitina como sustrato con pH 5, e incluso más preferiblemente en el margen de 40-50°C, medida con lecitina como sustrato con pH 5.

La temperatura óptima para la actividad fosfolipasa fue medida en un tampón que incluye 2% lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM Britton Robinson tampón, con pH 5. Véase ejemplo para más detalles (véase abajo).

En otra forma de realización de la invención, una Fosfolipasa A aislada, la cual se obtiene de una cepa del género *Fusarium*, es preferiblemente una que tiene una actividad fosfolipasa con pH óptimo en el margen de pH de 6-12, a 37°C; más preferiblemente en el margen de pH de 7-11,5, a 37°C; más preferiblemente en el margen de pH de 8-11, a 37°C; e incluso más preferiblemente en el margen de pH de 8,5-11, a 37°C.

El pH óptimo de la actividad fosfolipasa fue determinado en un tampón que incluye 2% Lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR), a 37°C. Véanse ejemplos para más detalles.

Preferiblemente, una fosfolipasa de la invención consta de al menos dos de las cinco características físicas anteriormente mencionadas de la enzima (numeradas de i) a v)), más preferiblemente una fosfolipasa de la invención consta de al menos tres de las cinco características físicas anteriormente mencionadas de la enzima (numeradas de i) a v)), incluso más preferiblemente una fosfolipasa de la invención consta de al menos cuatro de las cinco características físicas anteriormente mencionadas de la enzima (numeradas de i) a v)), y más preferiblemente una fosfolipasa de la invención consta de

las cinco características físicas anteriormente mencionadas de la enzima (numeradas de i) a v)).

Tal como se ha descrito anteriormente, una fosfolipasa de la invención ha sido clonada, expresada recombinantemente, purificada, y se han determinado las secuencias N-terminal y C-terminal de la enzima activa secretada.

En consecuencia, otra forma de realización de la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa A, cuyo polipéptido se obtiene de una cepa del género *Fusarium* y tiene

- i) actividad PLA en el margen de pH 3-10, medido a 40°C;
- 10 ii) una masa molecular de 29 ± 10 kDa, como se ha determinado determinado por SDS-PAGE;
- iii) un punto isoeléctrico (pI) en el margen 4,5-8;
- iv) una temperatura óptima para una actividad fosfolipasa en el margen de 25-55°C, medida con lecitina como sustrato con pH 5; y/o
- 15 v) un pH de la actividad fosfolipasa óptimo en el margen de pH 6-12, medido con lecitina como sustrato a 37°C;

y adicionalmente consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que incluye:

- (a) un polipéptido codificado por la enzima fosfolipasa A que codifica parte de la
- 20 secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en las posiciones 31-346 de la secuencia ID No 2;
- (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la
- 25 posición 31-303 de secuencia ID No 2;
- (d) un análogo del polipéptido definido en (a), (b) o (c), el cual es homólogo en al menos un 70 % con dicho polipéptido; y
- (e) un fragmento de (a), (b) (c) o (d).

En una forma de realización de la invención, el polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención es la fosfolipasa con actividad fosfolipasa A1:

En otra forma de realización, el polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención es la fosfolipasa con actividad fosfolipasa A2 y, en incluso otra forma de realización, el polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa es según la invención la fosfolipasa con actividad fosfolipasa B.

35 Preferiblemente, dicho polipéptido aislado que tiene una actividad fosfolipasa según la invención es fosfolipasa con actividad fosfolipasa A1.

Para ejemplos específicos de técnicas estándar para medir la actividad individual PLA1, PLA2 y/o PLB se hace referencia a unos ejemplos.

- En otra forma de realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad fosfolipasa según la invención, donde la fosfolipasa es una fosfolipasa sustancialmente independiente de una concentración de Ca^{2+} medida como actividad fosfolipasa relativa a 5 mM EDTA y 5mM Ca^{2+} en un ensayo de la actividad fosfolipasa que mide la liberación de ácidos grasos sin lecitina en un tampón que incluye 2% lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM citrato, pH 5; incubado durante 10 min. a 37°C seguido por una parada de la reacción a 95°C durante 5 minutos; donde la proporción de actividad fosfolipasa relativa a 5mM EDTA/5 mM Ca^{2+} es superior a 0,25, más preferiblemente superior a 0,5 y más preferiblemente superior a 0,80.

Para más detalles relativos a la medición de la dependencia de la actividad enzimática en la concentración Ca^{2+} , se hace referencia a unos ejemplos.

- Algunas lipasas pueden tener una actividad fosfolipasa limitada. En el presente contexto, esta actividad fosfolipasa limitada de dichas lipasas se definen como "una lipasa con actividad fosfolipasa lateral" (véase sección "Definiciones"). La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una actividad fosfolipasa, donde la actividad fosfolipasa de dicho polipéptido aislado es tan alta como es de relevancia industrial.

- En consecuencia, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una actividad fosfolipasa según la invención, donde la fosfolipasa es una fosfolipasa que tiene una actividad fosfolipasa que es al menos de 0,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos de 0,40 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; medido en un ensayo de la fosfolipasa monomolecular de la manera siguiente:

- a. en un equipo monomolecular (cuba de orden cero) en una superficie íntegramente purificada de una solución tampón (10 mM TRIS, pH 8,0, 25°C) se extiende una capa monomolecular del fosfolípido DDPC (Di Dicanoil (C10) Fosfatidil Colina) de una solución de cloroformo;
- b. tras la relajación de la capa monomolecular (evaporación del cloroformo), se ajusta la presión de la superficie a 15 mN/m, correspondiente a una área media molecular de DDPC de aproximadamente 63 Å²/molécula;
- c. se inyecta una solución tampón (como la anterior) que contiene 60 µg de enzima a través de la capa monomolecular en la subfase del compartimiento de la reacción (cilindro con área 1520 mm² y volumen 30400 mm³) en el "cuba de orden cero";
- d. la actividad enzimática se determina a través de la velocidad de una barrera móvil que comprime la capa monomolecular con el objetivo de mantener la presión de la superficie constante, mientras las moléculas de sustrato insolubles son hidrolizadas en

productos de reacción más hidrosolubles, donde el número de moléculas DDPC hidrolizadas por minuto por la enzima se estima desde el área media molecular (MMA) de DDPC.

Véase la sección "Definiciones" y ejemplos para más descripciones de las cantidades preferidas de las actividades fosfolipasas para un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención.

Además, la actividad fosfolipasa específica de una fosfolipasa según la invención puede medirse mediante unos ensayos estándar de la actividad fosfolipasa conocidos.

En consecuencia, en otra forma de realización la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención, donde la fosfolipasa es una fosfolipasa que tiene una actividad fosfolipasa capaz de liberar al menos 7 μmol de ácido graso libre/min./mg enzima; más preferiblemente al menos 15 μmol de ácido graso libre/min./mg enzima; incluso más preferiblemente al menos 30 μmol de ácido graso libre/min./mg enzima, y más preferiblemente al menos 50 μmol de ácido graso libre/min./mg enzima medido de la manera siguiente:

La actividad fosfolipasa es medida en un ensayo que mide la liberación de ácidos grasos libres de lecitina en un tampón que incluye 2% lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM citrato, pH 5; incubado durante 10 min. a 37°C seguido por una parada de reacción a 95°C durante 5 minutos.

Para más detalles relativos a esta forma de realización de la invención se hace referencia a unos ejemplos.

Un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención es muy adecuado para realizar el desgomado enzimático de un aceite comestible.

En consecuencia, la invención se refiere a:

1. un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención, donde la fosfolipasa es capaz de realizar el desgomado enzimático de un aceite comestible, según un método de la invención con el objetivo de reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible que incluye un contenido de fósforo no hidratable de al menos 50 ppm; y
2. un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención, donde la fosfolipasa es capaz de realizar el desgomado enzimático de un aceite comestible desgomado con agua (que tiene un contenido de fósforo de 50-250 ppm) reduciendo de ese modo el contenido de fósforo del aceite a menos de 11 ppm, donde el proceso del desgomado enzimático consta del contacto de dicho aceite a un pH de 1,5-8 con una solución acuosa de la fosfolipasa que es emulsionada en el aceite hasta que el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 ppm y separando posteriormente la fase acuosa del aceite tratado.

Preferiblemente, el polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa según la invención es capaz de realizar dicho proceso de desgomado enzimático del aceite comestible desgomado con agua (definido anteriormente) en menos de 1,5 horas y usa menos de 2 mg fosfolipasa (sustancia seca) / kg de aceite.

- 5 Preferiblemente, un polipéptido aislado que presenta actividad fosfolipasa y que tiene la característica anteriormente mostrada de la invención se obtiene de una cepa fúngica filamentosa dentro del género *Fusarium*.

- No obstante, sin limitarse a cualquier teoría actualmente se contempla que una fosfolipasa de la invención puede también obtenerse de otro microorganismo,
10 preferiblemente otra cepa fúngica filamentosa. En la sección "Fuente microbiana" se ofrecen unos ejemplos (véase abajo).

Secuencia clonada de ADN

- A pesar de varias dificultades técnicas (véase abajo sección "Protocolo para la
15 clonación de una fosfolipasa fúngica filamentosa"), los presentes inventores han sido capaz de clonar una fosfolipasa que presenta actividad PLA de una cepa del género *Fusarium*, más específicamente *Fusarium oxysporum*.

- Además, actualmente se cree que es posible clonar una fosfolipasa A y/o una fosfolipasa B relacionada que codifica la secuencia de ADN basada en la información de
20 la secuencia proporcionada en la presente solicitud.

En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN que codifica una enzima que presenta actividad fosfolipasa A y/o fosfolipasa B, cuya secuencia de ADN es seleccionada del grupo que incluye:

- (a) la parte que codifica la fosfolipasa A del polinucleótido clonado en plásmido pYES
25 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) la secuencia de ADN mostrada en la posiciones 23-1063 en la secuencia ID No 1, más preferiblemente las posiciones 113-1063 en la secuencia ID No 1, o incluso más preferiblemente las posiciones 113-929 en la secuencia ID No 1, o su cadena complementaria;
- 30 (c) una secuencia de ADN que es homóloga al menos en un 70% con dicha secuencia de ADN definida en (a) o (b);
- (d) una secuencia de ADN definida en (a) o (b), la cual codifica un polipéptido que presenta actividad fosfolipasa y es homóloga al menos en un 70% con la
35 secuencia polipeptídica mostrada en las posiciones 31-346 de la secuencia ID No 2, o más preferiblemente homóloga al menos en un 70% con la secuencia polipeptídica mostrada en las posiciones 31-303 de la secuencia ID No 2;

- (e) una secuencia de ADN que hibridiza con una sonda de ADN de doble cadena que incluye la secuencia de ADN mostrada en las posiciones 23-1063 en la secuencia ID No 1 con rigor bajo;
- (f) una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos de residuos 1 a 346, 31 a 346 o 31 a 303 de la secuencia ID No 2 o las secuencias de aminoácidos codificadas por cualquiera de las secuencias de ADN de (e); y
- (g) una secuencia de ADN que es un fragmento de las secuencias de ADN especificadas en (a), (b), (c), (d), (e), o (f).

En esta especificación, cuando se hace referencia a la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia clonada de ADN en plásmido pYES 2,0 presente en DSM 11299, tal referencia está también destinada a incluir la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia de ADN presentada en la secuencia ID No 1.

En consecuencia, los términos "la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia clonada de ADN en plásmido pYES 2,0 presente en DSM 11299" y "la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia de ADN presentada en la secuencia ID No 1" puede utilizarse indistintamente.

La secuencia de ADN puede ser de origen genómico, ADNc o sintético o de cualquier combinación de los mismos.

La presente invención incluye también una secuencia clonada de ADN que codifica una enzima que presenta actividad fosfolipasa A y/o fosfolipasa B que tiene la secuencia de aminoácidos presentados como la parte madura de la secuencia ID No 2, la cual difiere de la secuencia ID No 1 por la degeneración del código genético.

La secuencia de ADN mostrada en la secuencia ID No 1 y/o una secuencia de ADN análoga de la invención puede clonarse de una cepa del *Fusarium oxysporum* fúngica filamentosa que produce la enzima con actividad fosfolipasa, u otro organismo relacionado como se describe con más detalle a continuación (véase sección "Fuentes microbianas").

De forma alternativa, la secuencia análoga puede formarse basándose en la secuencia de ADN presentada como la parte que codifica la fosfolipasa de la secuencia ID No. 1, p. ej. puede ser una subsecuencia, y/o formarse mediante la introducción de sustituciones del nucleótido que no originan otra secuencia de aminoácidos de la fosfolipasa codificada por la secuencia de ADN, pero corresponde con el uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por la introducción de sustituciones del nucleótido que pueden originar una secuencia de aminoácidos diferente (es decir una variante de la fosfolipasa de la invención).

Cuando se realizan sustituciones del nucleótido, los cambios de aminoácidos son preferiblemente de carácter menor, es decir sustituciones conservadoras del aminoácido que no afectan significativamente el pliegue o actividad de la proteína; pequeñas eliminaciones, normalmente de uno hasta aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de aminoterminal o carboxilterminal, como un residuo aminoterminal de metionina; un péptido de enlace pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación, como un tracto polihistidina; un epitopo antigénico o un dominio de unión.

Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos, como arginina, lisina, histidina; aminoácidos ácidos, como ácido glutámico y ácido aspártico; aminoácidos polares, como glutamina y asparagina; aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, isoleucina, valina; aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, triptófano, tirosina; y aminoácidos pequeños, como glicina, alanina, serina, treonina, metionina. Para una descripción general de sustitución del nucleótido, véase p. ej. Ford et al., (1991), *Protein Expression and Purification* 2, 95-107.

Será obvio para los expertos en la técnica que dichas sustituciones pueden llevarse a cabo fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula y dando todavía como resultado un polipéptido activo. Aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia clonada de ADN de la invención y en consecuencia no sometida preferiblemente a la sustitución pueden identificarse según unos procedimientos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (cf. p. ej. Cunningham y Wells, (1989), *Science* 244, 1081-1085). En la última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo de la molécula y las moléculas mutantes producidas se evalúan por su actividad biológica (es decir fosfolipasa) para identificar los residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. También pueden determinarse los lugares de interacción sustrato-enzima mediante análisis de la estructura cristalina tal como se determina por técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (cf. p. ej. de Vos et al., (1992), *Science* 255, 306-312; Smith et al., (1992), *J. Mol. Biol.* 224, 899-904; Wlodaver et al., (1992), *FEBS Lett.* 309, 59-64).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen también polipéptidos fundidos o polipéptidos divisibles por fusión, en los cuales está fundido otro polipéptido en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fundido se produce al fundir una secuencia de ácido nucleico (o una porción) que codifica otro polipéptido para una secuencia de ácido nucleico (o una porción) de la presente invención. En la técnica se conocen técnicas para la producción de polipéptidos fundidos e incluyen la ligadura de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de

modo que se encuentran en 'marco' y de modo que la expresión del polipéptido fundido está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

La secuencia de ADN de la invención puede clonarse de la cepa *Escherichia coli* DSM No. 11299 usando técnicas de clonación estándar p. ej. tal como está descrito por Sambrook et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.

Puesto que los presentes inventores han resuelto el problema de desarrollar un ensayo de rastreo adecuado para su uso en una técnica de clonación por expresión para clonar una fosfolipasa de la invención, véase la sección con el título "Protocolo para la clonación de una fosfolipasa fúngica filamentosa", la secuencia de ADN de la invención puede ahora clonarse por cualquier método general que implique

- clonación, en vectores adecuados, una biblioteca de ADNc de cualquier organismo supuesto para producir la fosfolipasa de interés,
- transformación de células huésped de levadura adecuadas con dichos vectores,
- cultivo de las células huésped bajo condiciones adecuadas para expresar cualquier enzima de interés codificada por un clon en la biblioteca de ADNc,
- selección de clones positivos determinando cualquier actividad fosfolipasa de la enzima producida por dichos clones, y
- aislamiento del ADN que codifica la enzima de dichos clones.

De forma alternativa, puesto que la presente invención proporciona por primera vez una secuencia clonada de ADN que codifica una enzima PLA fúngica filamentosa, el ADN que codifica una fosfolipasa de la invención puede, según procedimientos bien conocidos, ser clonado convenientemente de una fuente adecuada como cualquiera de los organismos mencionados en la sección "Fuentes microbianas", usando sondas sintéticas de oligonucleótido preparadas sobre la base de una secuencia de ADN descrita aquí. Por ejemplo, una sonda de oligonucleótido adecuada puede ser preparada basándose en la parte que codifica fosfolipasa de las secuencias nucleótídicas presentadas como SEC ID No 1 o cualquier subsecuencia adecuada de la misma, o la base de la secuencia de aminoácidos SEC ID No 2.

Adicionalmente, puesto que una secuencia clonada de ADN de la invención codifica un polipéptido que tiene actividad fosfolipasa según la invención, un número de las formas de realización específicas relativas a un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa de la invención son también formas de realización de la invención para una secuencia clonada de ADN de la invención que codifica un polipéptido que tiene actividad fosfolipasa. Consecuentemente, referencias y formas de realización preferidas de dicho polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa se refieren también a una secuencia clonada de ADN de la invención.

En consecuencia, una forma de realización de la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa A1.

En otra forma de realización, una secuencia clonada según la invención es una secuencia clonada de ADN, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa A2 y, en incluso una forma de realización adicional, una secuencia clonada según la invención es una secuencia clonada de ADN, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa B.

Preferiblemente, dicha secuencia clonada de ADN según la invención codifica un polipéptido que tiene actividad fosfolipasa A1.

Adicionalmente, la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa que es sustancialmente independiente de la concentración Ca^{2+} medida como:

actividad fosfolipasa relativa a 5 mM EDTA y 5mM Ca^{2+} en un ensayo de la actividad fosfolipasa que mide la liberación de ácidos grasos libres de lecitina en un tampón que incluye 2% lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM citrato, pH 5; incubado durante 10 min. a 37°C seguido por una parada de reacción a 95°C durante 5 minutos.; donde la proporción de actividad fosfolipasa relativa a 5mM EDTA/5 mM Ca^{2+} es una proporción que es superior a 0,25, más preferiblemente una proporción que es superior a 0,5.

Todavía más, la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa que tiene una actividad fosfolipasa que es al menos 0,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; más preferiblemente al menos 0,40 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg, a 25°C; medido en un ensayo de la fosfolipasa monomolecular de la manera siguiente:

- a. en un equipo monomolecular (cuba de orden cero) en una superficie íntegramente purificada de una solución tampón (10 mM TRIS, pH 8,0, 25°C) una capa monomolecular del fosfolípido DDPC (Di Dicanoil (C10) Fosfatidil Colina) se extiende desde una solución de cloroformo;
- b. tras la relajación de la capa monomolecular (evaporación del cloroformo), la presión de la superficie se ajusta a 15 mN/m, correspondiente a una área media molecular de DDPC de aproximadamente 63 Å²/molécula;
- c. una solución tampón (como la anterior) con 60 µg de enzima se inyecta a través de la capa monomolecular en la subfase del compartimiento de reacción (cilindro con área 1520 mm² y volumen 30400 mm³) en el "cuba de orden cero";
- d. la actividad enzimática se determina a través de la velocidad de una barrera móvil que comprime la capa monomolecular con el objetivo de mantener la presión de la superficie

constante, mientras las moléculas del sustrato insolubles son hidrolizadas en productos de reacción más hidrosolubles, donde el número de DDPC-moléculas hidrolizadas por minuto por la enzima se estima del área media molecular (MMA) de DDPC.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es una fosfolipasa que tiene una actividad fosfolipasa capaz de liberar al menos 7 μmol de ácido graso libre/ min./ mg enzima; más preferiblemente al menos 15 μmol de ácido graso libre/ min./ mg enzima; medido de la siguiente manera:

La actividad fosfolipasa es medida en un ensayo que mide la liberación de ácidos grasos libres de lecitina en un tampón que incluye 2% lecitina, 2% Tritón X-100; 20 mM citrato, pH 5; incubado durante 10 min. a 37°C seguido por una parada de reacción a 95°C durante 5 minutos.

En formas de realización adicionales, la invención se refiere a:

una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es capaz de realizar el desgomado enzimático de un aceite comestible según un método de la invención con el objetivo de reducir la cantidad de componentes con fósforo en un aceite comestible que incluye un contenido de fósforo no hidratable de al menos 50 ppm; y

una secuencia clonada de ADN según la invención, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es capaz de realizar un desgomado enzimático de un aceite comestible desgomado con agua (que tiene un contenido de fósforo de 50-250 ppm) reduciendo de ese modo el contenido de fósforo del aceite a menos de 11 ppm, donde el proceso de desgomado enzimático consta del contacto de dicho aceite a un pH de 1,5-8 con una solución acuosa de la fosfolipasa, la cual es emulsionada en el aceite hasta que el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 partes por millón, y separando posteriormente la fase acuosa del aceite tratado.

Preferiblemente, una secuencia clonada de ADN según la invención es una secuencia clonada de ADN, donde la fosfolipasa codificada por dicha secuencia de ADN es capaz de realizar dicho proceso de desgomado enzimático del aceite comestible desgomado con agua usando menos de 2 mg de la fosfolipasa (sustancia seca) / kg de aceite, y donde la fosfolipasa está en contacto con dicho aceite durante un período de tiempo de 15 minutos a 2 horas.

Protocolo para la clonación de una fosfolipasa fúngica filamentosa

Hubo varias dificultades técnicas cuando se intentó aislar una fosfolipasa de la invención o clonar una codificación del polinucleótido para ello. Parecía imposible aislar la enzima y el problema para clonar el polinucleótido continuaba.

Como se describe en la presente, no estaba disponible ninguna secuencia de ADN previa que codifica una fosfolipasa fúngica filamentosa A. Consecuentemente, los presentes inventores desarrollaron una estrategia de clonación basada en la clonación por expresión en la técnica de levadura (H. Dalboege et al. Mol. Gen. Genet. (1994) 243:253-260.; WO 93/11249; y WO 94/14953).

Uno de los principales problemas de esta técnica es que la levadura produce una actividad interna que provoca bases de la fosfolipasa en ensayos de placa. Estas bases resultaron ser altamente dependientes de la cantidad de sustrato en las placas de ensayo y, por este motivo, la cantidad de sustrato tenía que valorarse cuidadosamente a un nivel donde las bases fueran suficientemente bajas para que el ensayo fuese fiable durante el procedimiento de selección de la clonación por expresión, pero suficientemente altas para que la reacción tuviera lugar.

Además, las cepas fúngica filamentosa comprenden en general varias lipasas diferentes, algunas de las cuales incluso presentan una actividad fosfolipasa limitada. Dichas lipasas se definen aquí como "una lipasa con una actividad fosfolipasa lateral" (véase sección "Definiciones" de la presente invención).

En el ensayo de placa, también se observó que las bases de dichas lipasas con una actividad fosfolipasa lateral eran altamente dependientes de la cantidad de sustrato en las placas de ensayo y, de este manera, la cantidad de sustrato tenía que incluso valorarse más cuidadosamente con el objetivo de eliminar la actividad de base de tanto las células de levadura como de las lipasas fúngicas filamentosas con actividad fosfolipasa lateral.

Además, se descubrió que tenía que realizarse una selección cuidadosa del sustrato, puesto que muchos no suministraron ninguna solución funcional a este problema, ya que varios de los sustratos de la fosfolipasas evaluados dieron una actividad de base porque las lipasas, sin actividad fosfolipasa, pudieron reaccionar sobre los sustratos. En consecuencia, con el objetivo de identificar un sustrato adecuado un alto número de sustratos tenían que ser evaluados y valorados.

La solución encontrada para poder realizar la clonación por expresión de un polinucleótido que codifica fosfolipasa fue usar Lipoid E80 (de Lipoid GmbH) en unas concentraciones cuidadosamente controladas. En la sección Materiales y Método de la presente se presenta una descripción detallada de la clonación por expresión completa en protocolo de la levadura, incluyendo un ensayo de placa que resuelve los problemas descritos anteriormente.

Homología/identidad de secuencias de ADN

La homología/identidad de secuencias de ADN arriba mencionada se determina como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una desviación de la primera secuencia de la segunda. La homología puede determinarse idóneamente mediante unos programas informáticos conocidos en la técnica, como GAP provisto en el paquete del programa GCG (*Program Manual for Wisconsin Package*, Versión 8, Agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)(Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Usando GAP con las siguientes disposiciones para la comparación de secuencias de ADN: pena de creación de GAP de 5,0 y pena de extensión de GAP de 0,3, la zona de codificación de la secuencia de ADN presenta un grado de identidad de preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97% con la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia de ADN mostrada en SEC ID No 1 (es decir posición 23-1063 en SEC ID No 1); o más preferiblemente con la secuencia de ADN mostrada en la posición 113-1063 en SEC ID No 1 (pos. 113 corresponde al residuo N-terminal de la enzima madura); o incluso más preferiblemente con la secuencia de ADN mostrada en la posición 23-929 en SEC ID No 1 (pos. 929 corresponde al residuo C-terminal en la enzima secretada y procesada de C-terminal).

Hibridación

La hibridación mencionada se destina a comprender una secuencia de ADN análoga que se hibridiza en una sonda de ADN de doble cadena correspondiente a la parte que codifica fosfolipasa de la secuencia de ADN mostrada en SEC ID No 1, es decir nucleótidos 23-1063, o más preferiblemente con una sonda de ADN de doble cadena correspondiente a la secuencia de ADN mostrada en la posición 113-1063 en SEC ID No 1 (pos. 113 corresponde con el residuo N-terminal de la enzima madura); o incluso más preferiblemente con una sonda de ADN de doble cadena correspondiente a la secuencia de ADN mostrada en la posición 23-929 en SEC ID No 1 (pos. 929 corresponde con el residuo C-terminal en la enzima activa secretada y procesada de C-terminal); según al menos unas condiciones de rigor bajo tal como se describe con más detalle abajo.

Las condiciones experimentales adecuadas para determinar una hibridación con rigor bajo, medio o alto entre una sonda de nucleótido y una secuencia de ADN o ARN homóloga implican una preinmersión del filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridizar en 5 x SSC (cloruro de sodio/ citrato de sodio, Sambrook et al. 1989) durante 10 minutos y prehibridización del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt (Sambrook et al. 1989), 0,5 % SDS y 100 µg/ml del ADN de espermatozoos de

salmón desnaturalizado y sometido a un baño de ultrasonido (Sambrook et al. 1989), seguida de hibridación en la misma solución con 10 ng/ml de una sonda cebada aleatoriamente (Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132:6-13), marcada ^{32}P -dCTP (actividad específica $> 1 \times 10^9$ cpm/ μg) durante 12 horas alrededor de 45°C. Entonces se lava el filtro dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, 0,5 % SDS a una temperatura de al menos 55°C (rigor bajo), más preferiblemente al menos 60°C (rigor medio), además más preferiblemente al menos 65°C (rigor medio/alto), incluso más preferiblemente al menos 70°C (rigor alto), incluso más preferiblemente al menos 75°C (rigor muy alto).

Las moléculas a las cuales la sonda de oligonucleótido hibridiza bajo estas condiciones son detectadas usando una película radiográfica.

Se ha descubierto que es posible pronosticar teóricamente si dos secuencias de ADN dadas se hibridarán o no bajo condiciones específicas determinadas.

En consecuencia, como una alternativa al método experimental descrito anteriormente, la determinación de si una secuencia de ADN análoga hibridará o no a la sonda de nucleótido anteriormente descrita, puede basarse en un cálculo teórico de la T_m (temperatura de fusión) en la que dos secuencias de ADN heterólogas con secuencias conocidas se hibridarán bajo unas condiciones específicas (p. ej. con respecto a la concentración de catión y temperatura).

Con el objetivo de determinar la temperatura de fusión para las secuencias del ADN heterólogas ($T_m(\text{hetero})$) es preciso determinar inicialmente la temperatura de fusión ($T_m(\text{homo})$) para las secuencias de ADN homólogas.

La temperatura de fusión ($T_m(\text{homo})$) entre dos secuencias totalmente complementarias de ADN (formación de homodúplex) puede determinarse usando la fórmula siguiente:

$T_m(\text{homo}) = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$ ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), donde

"M" denota la concentración de catión molar en tampón de lavado,

"%GC" % Guanina (G) y Citosina (C) del número total de las bases en la secuencia de ADN,

"% forma" % formamida en el tampón delavado, y

"L" la longitud de la secuencia de ADN.

Usando esta fórmula y las condiciones de lavado experimentales anteriormente mencionadas, la $T_m(\text{homo})$ para la formación de homodúplex de la sonda de nucleótido correspondiente a la secuencia de ADN mostrada en SEC ID No 1, es decir nucleótidos 23-1060 es:

$T_m(\text{homo}) = 81,5 + 16,6 (\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$

$T_m(\text{homo}) = 103,5^\circ \text{C}$.

"M": 2 X SSC corresponde con una concentración catiónica de 0,3M.

"%GC" El %GC en SEC ID No 1 pos. 23-1060 es de 56%

"% form": No hay ningún formamid en el tampón del lavado.

5 "L": La longitud de SEC ID No 1 SEC ID No 1 pos. 23-1063 1038 bp.

La T_m determinada por la fórmula anterior es la T_m de una formación de homodúplex ($T_m(\text{homo})$) entre dos secuencias de ADN totalmente complementarias. Con el objetivo de adaptar el valor T_m a aquel de dos secuencias del ADN heterólogas, se asume que un 1% de diferencia en la secuencia de nucleótidos entre las dos secuencias heterólogas equivale a una disminución de 1°C de la T_m ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995). En consecuencia, la $T_m(\text{hetero})$ para la formación de heterodúplex se obtiene al substraer la diferencia en % de la homología entre la secuencia análoga en cuestión y la sonda de nucleótido anteriormente descrita de la $T_m(\text{homo})$. El porcentaje de la homología de ADN que debe substraerse se calcula como se describe en este caso (véase arriba).

Homología para secuencias de aminoácidos

La homología del polipéptido mencionada anteriormente se determina como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una desviación de la primera secuencia a la segunda. La homología puede determinarse idóneamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica como GAP provisto en el paquete del programa GCG (*Program Manual for the Wisconsin Package*, Versión 8, Agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453).

25 Usando GAP con las siguientes disposiciones para la comparación de la secuencia polipeptídica: pena de creación del GAP de 3,0 y pena de extensión del GAP de 0,1, la parte madura de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN análoga presenta un grado de identidad preferiblemente de al menos 70%, más preferiblemente al menos de 80%, más preferiblemente al menos de 90%, más preferiblemente al menos de 95%, especialmente al menos de 97% con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID No 2, es decir posición 31-346 en SEC ID No 2, o más preferiblemente con la secuencia de aminoácidos mostrada en la posición 31-303 de SEC ID No 2 (pos. 303 es el residuo C-terminal en la enzima activa, secretada y procesada de C-terminal).

35 La presente invención se dirige también a unas variantes de la fosfolipasa con una secuencia de aminoácidos que no difiere en más de tres aminoácidos, preferiblemente en

no más de dos aminoácidos, y más preferiblemente en no más de un aminoácido de la parte madura de la secuencia de aminoácidos presente en la SEC ID No 2.

Además, las identidades del aminoácido preferidas mencionadas anteriormente también se refieren a un análogo de una secuencia clonada de ADN de la invención, cuya
 5 secuencia codifica un polipéptido que presenta actividad fosfolipasa y que es homóloga al menos en un 70% con la secuencia polipeptídica mostrada en las posiciones 31-346 de la SEC ID No 2, o más preferiblemente homóloga al menos en un 70% con la secuencia polipeptídica que incluye las posiciones 31-303 de SEC ID No 2.

10 Reactividad cruzada inmunológica

Los anticuerpos que se utilizan para determinar la reactividad cruzada inmunológica pueden prepararse usando una fosfolipasa purificada. Más específicamente, el antisuero contra la fosfolipasa de la invención puede aumentar mediante la inmunización de conejos (u otros roedores) según el procedimiento descrito
 15 por N. Axelsen et al. en *A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis*, Blackwell Scientific Publications, 1973, Capítulo 23, o A. Johnstone y R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, 1982 (más específicamente p. 27-31). Las inmunoglobulinas purificadas pueden obtenerse del antisuero obtenido, por ejemplo por la precipitación de sal ((NH₄)₂ SO₄), seguido por diálisis y cromatografía de intercambio
 20 iónico, e.g. en DEAE-Sefadex. La caracterización inmunoquímica de las proteínas pueden realizarse bien por el análisis de doble difusión de Ouchterlony (O. Ouchterlony in: *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), por inmuno-electroforesis cruzada (N. Axelsen et al., supra, Capítulos 3 y 4), o por inmuno-electroforesis de cohete (N. Axelsen et al., Capítulo
 25 2).

Fuentes microbianas

En la fecha de prioridad de la presente invención, la taxonomía aplicada abajo es conforme al navegador de la taxonomía NCBI del World Wide Web (WWW).

30 Un polipéptido aislado que tiene actividad fosfolipasa y la secuencia clonada de ADN correspondiente de la invención puede obtenerse de cualquier microorganismo, preferiblemente un hongo filamentoso, una célula de levadura, o una bacteria.

Preferiblemente, una fosfolipasa y la secuencia clonada de ADN correspondiente de la invención puede obtenerse de una cepa fúngica filamentosa, donde un tipo
 35 preferido es *Ascomycota*, donde una clase preferida es *Pyrenomycetes* que incluye la familia preferida *Nectriaceae*.

Más preferiblemente, la fosfolipasa y la secuencia clonada de ADN correspondiente de la invención pueden obtenerse de una cepa del género *Fusarium*, como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, o *F. solani*, en particular una cepa de *Fusarium oxysporum*.

5. Además, una fosfolipasa y la secuencia clonada de ADN correspondiente de la invención puede obtenerse de una cepa fúngica filamentosa dentro del género *Aspergillus*, como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o en particular *Aspergillus oryzae*.

10. Un aislamiento de una cepa de *Fusarium oxysporum*, de la cual puede obtenerse una fosfolipasa de la invención, se ha depositado según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patente en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, República federal de Alemania, (DSM).

15. Fecha de depósito: 6 Junio 1983
Referencia del depositante: NN041759
DSM No.: *Fusarium oxysporum* DSM No. 2672

20. Además, el plásmido de expresión pYES 2,0 que incluye la longitud total de la secuencia de ADNc que codifica fosfolipasa de la invención se ha transformado en una cepa de *Escherichia coli* que se depositó según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patente en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, República federal de Alemania, (DSM).

25. Fecha de depósito: 25 Noviembre 1996
Referencia del depositante: NN049279
DSM No.: *Escherichia coli* DSM No. 11299

Vectores de expresión

30. El vector de expresión de la invención puede ser cualquier vector de expresión, es decir convenientemente sujeto a procedimientos de ADN recombinantes, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la cual tiene que introducirse el vector. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, la reproducción del cual es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser aquel que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se reproduce junto con el cromosoma(s) en el cual se ha integrado.
- 35.

En el vector de expresión, la secuencia de ADN que codifica fosfolipasa estaría operativamente conectada a una secuencia adecuada de terminación y promotora. La promotora puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra una actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de proteínas que codifican genes que son bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los procedimientos usados para enlazar la codificación de las secuencias de ADN para la fosfolipasa, la promotora y la de terminación y para insertarlas en vectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica (cf. p. ej. Sambrook et al., (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY).

Ejemplos de promotoras adecuadas para su uso en células huésped fúngicas filamentosas son, p. ej. la promotora ADH3 (McKnight et al., *The EMBO J.* 4 (1985), 2093 - 2099) o la promotora tpiA. Ejemplos de otras promotoras útiles son esos derivados del gen que codifica amilasa de *Aspergillus oryzae* TAKA, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutral de *Aspergillus niger*, α -amilasa de ácido estable de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (gluA) de *Aspergillus awamori* o *Aspergillus niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* isomerasa del fosfato de triosa de *Aspergillus oryzae* o acetamidasa de *Aspergillus nidulans*.

20 Células huéspedes

La presente invención también se refiere a células huéspedes recombinantes que incluyen una secuencia de ácido nucleico de la invención, las cuales pueden ventajosamente usarse en la producción recombinante de los polipéptidos. El término "célula huésped" comprende cualquier descendiente de una célula madre que es no idéntica a la célula madre debido a las mutaciones que tienen lugar durante la replicación.

La célula se transforma preferiblemente con un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico de la invención seguida por la integración del vector en el cromosoma huésped.

"Transformación" significa la introducción de un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped, de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico de propia replicación. La integración se considera generalmente una ventaja, ya que la secuencia de ácido nucleico es más posible que sea mantenida de manera estable en la célula. La integración del vector en el cromosoma huésped puede tener lugar por recombinación homóloga o no homóloga en el modo descrito anteriormente.

En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula fúngica.

"Fungi" como se utiliza en este caso incluye el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (tal como se define por Hawksworth et al., En, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB Internacional, University Press, Cambridge, UK) así como el *Oomycota* (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, 5 página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra). Grupos representativos de *Ascomycota* incluyen, p. ej., *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) y las levaduras verdaderas anteriormente catalogadas. Ejemplos de *Basidiomycota* incluyen hongos, herrumbres y tizones. Grupos representativos de *Chytridiomycota* incluyen, p. ej., *Allomyces*, 10 *Blastocladiella*, *Coelomomyces* y hongos acuáticos. Grupos representativos de *Oomycota* incluyen, p. ej., hongos acuáticos de saprolegniomycetous (moldes de agua) como *Achlya*. Ejemplos de hongos mitospóricos incluyen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* y *Alternaria*. Grupos representativos de *Zygomycota* incluyen, p. ej., *Rhizopus* y *Mucor*.

En una forma de realización preferida, la célula huésped fúngica es una célula 15 fúngica filamentosa. "Hongo filamentoso" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (tal como se define por Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan por un micelio vegetativo compuesto de quitina, celulosa, glucano, quitosana, manana y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo tiene lugar por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es 20 estrictamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar mediante el brote de un tallo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de una especie de, pero no limitada a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, 25 *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, y *Trichoderma* o un teleomorfo o sinónimo del mismo. En otra forma de realización aún más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Aspergillus*. En otra forma de realización aún más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Acremonium*. En otra forma de realización aún más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula 30 *Fusarium*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Humicola*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Mucor*. En otra forma de realización incluso más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Myceliophthora*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Neurospora*. En 35 otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Penicillium*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Thielavia*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica

- filamentosa es una célula *Tolypocladium*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Trichoderma*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otra
- 5 forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Fusarium* de la sección Discolor (también conocida como la sección de *Fusarium*): En otra forma de realización preferida, la célula madre fúngica filamentosa es una cepa de *Fusarium* de la sección Elegans, p. ej., *Fusarium oxysporum*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Humicola insolens* o
- 10 *Thermomyces lanuginosa*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Rhizomucor miehei*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Myceliophthora thermophilum*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Neurospora crassa*. En otra forma de realización preferida, la
- 15 célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Penicillium purpurogenum*. En otra forma de realización preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Thielavia terrestris*. En otra forma de realización preferida, la célula *Trichoderma* es una célula *Trichoderma Harzianum*, *Trichoderma Koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma Reesei* o *Trichoderma viride*.
- 20 Las células fúngicas pueden transformarse por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la membrana celular en una manera conocida per se. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes *Aspergillus* se describen en la EP 238 023 y en Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474.
- 25 Un método adecuado para transformar la especie *Fusarium* es descrito por Malardier et al., 1989, *Gene* 78:147-156 o en la patente divisional US No de serie 08/269,449. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, En Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New
- 30 York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153:163; y Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA* 75:1920. Células mamíferas pueden transformarse mediante respuesta directa usando el método de precipitación del fosfato de calcio de Graham y Van der Eb (1978, *Virology* 52:546).
- 35 **Método para producir fosfolipasa**
- La presente invención proporciona un método para producir una enzima aislada según la invención, donde una célula huésped adecuada, la cual ha sido transformada

con una secuencia de ADN que codifica la enzima, es cultivada bajo condiciones que permiten la producción de la enzima, y la enzima resultante es recuperada del cultivo.

Cuando un vector de expresión que incluye una secuencia de ADN que codifica la enzima se transforma en una célula huésped heteróloga puede permitir la producción recombinate heteróloga de la enzima de la invención.

De ese modo es posible obtener una composición de la fosfolipasa altamente purificada, caracterizada por ser libre de impurezas homólogas.

En la presente invención la célula huésped homóloga puede ser una cepa de *Fusarium oxysporum*.

El medio usado para cultivar las células huéspedes transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huéspedes en cuestión. La fosfolipasa expresada puede convenientemente ser secretada en el medio de cultivo y recuperada mediante procedimientos bien conocidos que incluyen la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal como sulfato amónico, seguido por unos procedimientos cromatográficos como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

Uso de la fosfolipasa

A parte del uso de una fosfolipasa en un método nuevo de la invención para el desgomado enzimático de un aceite comestible, el cual incluye una alta cantidad de fósforo no hidratable, también se conocen otros usos de la fosfolipasas.

Dichos usos/aplicaciones en la técnica conocida de la fosfolipasas se describen a continuación.

La fosfolipasa de la invención puede usarse en cualquier aplicación deseada para hidrolizar el grupo(s) acilo graso de un fosfolípido o liso-fosfolípido, como lecitina o liolecitina. La fosfolipasa se utiliza preferiblemente a pH 3-10 y a 30-70°C (particularmente 40-60°C). Si se desea, la fosfolipasa puede inactivarse después de la reacción sometiéndola a un tratamiento térmico, p. ej. a pH 7, 80°C durante 1 hora o 90°C durante 10 minutos.

Como ejemplo, la fosfolipasa de la invención puede usarse en la preparación de masa, pan y pasteles, p. ej. para mejorar la elasticidad del pan o del pastel. Así, la fosfolipasa puede usarse en un proceso para hacer pan, el cual incluye la adición de la fosfolipasa a los ingredientes de una masa, amasadura de la masa y cocción de la masa para hacer el pan. Esto puede hacerse en analogía con US 4,567,046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) o EP 426211 (Unilever).

La fosfolipasa de la invención puede también usarse para mejorar la filtrabilidad de una solución acuosa o pasta basada en carbohidratos mediante su tratamiento con fosfolipasa. Esto es aplicable particularmente a una solución o pasta que contiene un hidrolizado de almidón, especialmente un hidrolizado de almidón de trigo, puesto que éste suele ser difícil de filtrar y a producir filtrados turbios. El tratamiento puede hacerse en analogía con EP 219,269 (Internacional CPC).

Además, una fosfolipasa de la invención puede usarse para la hidrólisis parcial de fosfolípidos, preferiblemente Lecitina, para obtener mejores emulsionantes del fosfolípido. Esta aplicación se describe en las hojas del producto para Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) relativa a este uso y en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Publisher: VCH Weinheim (1996)).

Además, una fosfolipasa de la invención puede usarse en un proceso para la producción de un pienso que comprende la mezcla de la fosfolipasa con sustancias alimenticias y al menos un fosfolípido. Esto puede hacerse en analogía con EP 743 017.

Desgomado de aceites vegetales/comestible según procedimientos conocidos en la técnica

Según procedimientos conocidos en la técnica, la fosfolipasa de la invención puede usarse en un proceso para reducir el contenido de fosfolípidos en un aceite comestible, el cual incluye el tratamiento del aceite con fosfolipasa para hidrolizar una parte importante del fosfolípido y la separación de una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite. Este proceso es aplicable a la purificación de cualquier aceite comestible que contiene fosfolípido, p. ej. aceite vegetal como aceite de soja, aceite de semilla de colza y aceite de girasol.

Antes del tratamiento enzimático, el aceite vegetal es preferiblemente pretratado para eliminar el limo (mucilago), p. ej. mediante refinado húmedo. Normalmente, el aceite contendrá 50-250 partes por millón de fósforo como fosfolípido en la iniciación del tratamiento con fosfolipasa y la invención del proceso puede reducir este valor a menos de 11 ppm, más preferiblemente a menos de 5 ppm.

El tratamiento enzimático se realiza mediante la dispersión de una solución acuosa de la fosfolipasa, preferiblemente en gotitas con un diámetro promedio inferior a 10 μ (micro)m. La cantidad de agua es preferiblemente de 0,5-5% por peso en relación con el aceite. Opcionalmente puede agregarse un emulsionante. Puede aplicarse agitación mecánica para mantener la emulsión.

El tratamiento enzimático puede realizarse con cualquier pH en el margen 1,5-8. El pH puede ajustarse añadiendo ácido cítrico, un tampón de citrato o HCl.

Una temperatura adecuada es generalmente 30-70°C (particularmente 40-60°C). El tiempo de reacción normalmente será de 0,5-12 horas (p. ej. 2-6 horas); y una dosificación de la enzima adecuada será normalmente de 100-5000 IU por litro de aceite, particularmente 200-2000 IU/l.

- 5 El tratamiento enzimático puede realizarse de forma discontinua, p. ej. en un tanque con agitación, o continua, p. ej. una serie de reactores de tanque con agitación.

El tratamiento enzimático es seguido por la separación de una fase acuosa y una fase de aceite. Esta separación puede realizarse por medios convencionales, p. ej. centrifugado.

- 10 En otros aspectos, el proceso puede realizarse según principios conocidos en la técnica, p. ej. en analogía con US 5.264.367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM, 6 (12), 1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol., 95 (8), 300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); o EP 654.527 (Metallgesellschaft, Röhm).

15 **Uso de una fosfolipasa de la invención en la cocción**

- La fosfolipasa de la invención puede también usarse en los aditivos de mejoramiento del pan, p. ej. composiciones de la masa, aditivos de la masa, acondicionadores de la masa, premezclas y preparaciones similares convencionalmente añadidas a la harina y/o la masa durante los procesos para hacer el pan u otros
20 productos horneados, para proporcionar propiedades mejoradas del pan u otros productos horneados.

- En consecuencia, una forma de realización de la invención se refiere a un mejoramiento del pan y/o una composición de mejoramiento de la masa y, adicionalmente, al uso de una fosfolipasa de la invención en dichas composiciones, y a
25 una masa o producto horneado que incluye un mejoramiento del pan y/o una composición de mejoramiento de la masa de la invención.

- En el presente contexto los términos "composición de mejoramiento del pan" y "composición de mejoramiento de la masa" están destinados a indicar las composiciones que, además del componente enzimático, pueden comprender otras sustancias
30 convencionalmente usadas en la cocción para mejorar las propiedades de la masa y/o productos horneados. A continuación se ofrecen unos ejemplos de dichos componentes.

- En el presente contexto el término "propiedades mejoradas" está destinado a indicar cualquier propiedad que puede mejorarse por la acción de una enzima de la fosfolipasa de la invención. En particular, el uso de la fosfolipasas produce un aumento
35 del volumen y una mejora de la estructura migajosa y unas propiedades contra el gusto rancio del producto horneado, así como un aumento de la resistencia y la estabilidad y una reducción de la pegajosidad y, de ese modo, de la trabajabilidad de la masa. Se ha

descubierto que el efecto sobre la masa es particularmente bueno cuando se utiliza una harina de baja calidad. La mejora de la trabajabilidad es de particular importancia en conexión con la masa que tiene que ser procesada industrialmente.

Las propiedades mejoradas son valoradas por comparación con la masa y/o productos horneados preparados sin adición de la fosfolipasa según la presente invención.

La composición de mejoramiento del pan y/o de la masa de la invención puede comprender adicionalmente otra enzima. Ejemplos de otras enzimas son una celulasa, una hemicelulasa, una pentosanasa (útil para la hidrólisis parcial de pentosanas que aumentan la elasticidad de la masa), una glucosa oxidasa (útil para reforzar la masa), una lipasa (útil para la modificación de lípidos presentes en la masa o constituyentes de la masa para ablandar la masa), una peroxidasa (útil para perfeccionar la consistencia de la masa), una proteasa (útil para el debilitamiento del gluten, en particular cuando se usa harina de trigo dura), una peptidasa y/o una amilasa, p. ej. α -amilasa (útil para suministrar azúcares fermentables por levadura).

Además o como una alternativa para otros componentes enzimáticos, la composición que mejora la masa y/o el pan puede comprender una levadura artificial usada convencionalmente, p. ej. uno o más de los constituyentes siguientes:

Una leche en polvo (proporcionanodo color costra), gluten (para mejorar el poder de retención de gas de las harinas blandas), un emulsionante (para mejorar la elasticidad de la masa y la consistencia del pan resultante), grasa granulada (para ablandar la masa y la consistencia del pan), un oxidante (añadido para robustecer la estructura del gluten; p. ej. ej. ácido ascórbico, bromato de potasio, iodato de potasio o persulfato de amonio), un aminoácido (p. ej. cisteína), un azúcar y sal (p. ej. cloruro sódico, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio que sirve para hacer la masa más firme), harina o almidón.

Ejemplos de emulsionantes adecuados son los monoglicéridos o diglicéridos, ésteres del ácido tartárico de diacetilo de monoglicéridos o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres del ácido láctico de monoglicéridos, ésteres del ácido acéticos de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno, fosfolípidos y lecitina.

En el presente contexto el término "producto horneado" incluye cualquier producto obtenido a partir de la masa, tanto de carácter blando como crujiente. Ejemplos de productos horneados, que sean de tipo blanco, claro o oscuro, los cuales pueden ventajosamente producirse por la presente invención son pan (en particular blanco, integral o pan de centeno), normalmente en forma de hogazas o panecillos, barra de pan, pan de pita, tacos, pasteles, crêpes, galletas, pan crujiente y similares.

La masa de la invención puede ser de cualquiera de los tipos mencionados anteriormente y puede ser fresca o congelada.

Es obvio de la descripción anterior que la masa de la invención es normalmente una masa leudada o una masa que tiene que ser leudada. La masa puede leudarse de varias vías como mediante la adición de bicarbonato sódico o similar o la adición de una levadura (masa que fermenta), pero se prefiere leudar la masa mediante la adición de un cultivo de levadura adecuado como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cocción). Pueden emplearse cualquiera de las cepas de *S. cerevisiae* comercialmente disponibles.

En una forma de realización final la invención se refiere al uso de una fosfolipasa de la invención para la preparación de masa de pasta, preferiblemente obtenida a partir de harina de trigo duro o una harina de calidad comparable. La masa puede prepararse usando técnicas convencionales y la fosfolipasa usada en una dosificación similar a la descrita anteriormente. La fosfolipasa ha de ser preferiblemente de origen microbiano, tal como se describe aquí. Se contempla que usada en la preparación de la pasta, la fosfolipasa produce un aumento de la estructura del gluten y, así, una reducción de la pegajosidad de la masa y un aumento de la resistencia de la misma.

Uso de la actividad lipasa de una enzima de la invención

Como se muestra en los ejemplos, una fosfolipasa de la invención puede presentar adicionalmente actividad lipasa.

En consecuencia la invención se refiere, además, al uso de esta actividad lipasa en usos estándar de una lipasa, en particular para el uso en composiciones de limpieza y de detergente. Dichas composiciones de limpieza y de detergente se describen en la técnica y se hace referencia a WO 96/34946; WO 97/07202; y WO 95/30011 para una descripción adicional de composiciones de limpieza y de detergente adecuadas.

La invención está descrita con más detalle en los ejemplos siguientes, los cuales no están de ninguna manera destinados a limitar el objetivo de la invención tal como se reivindica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos depositados:

Fusarium oxysporum DSM No. 2672 comprende la secuencia de ADN que codifica la fosfolipasa de la invención.

Escherichia coli DSM 11299 que contiene el plásmido que comprende la longitud total de la secuencia de ADNc, codificando para la fosfolipasa de la invención, en el vector transportador pYES 2.0.

Otras cepas:

Cepa de levadura: La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada fue W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

Cepa de *E. coli*: DH10B (Tecnologías de vida)

5 Plásmidos:

El vector de expresión pHD414 de *Aspergillus* es un derivado del plásmido p775 (descrito en EP 238 023). La construcción de pHD414 está descrita en más detalle en WO 93/11249.

pYES 2,0 (Invitrogen)

10 pA2PH10 (véase ejemplo 7)

Métodos generales de la biología molecular

Excepto cuando se mencione de otra manera, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron usando métodos estándar de biología molecular

15 (Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) *"Current protocols in Molecular Biology"*. John Wiley y Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) *"Molecular Biological Methods for Bacillus"*. John Wiley and Sons, 1990).

Las enzimas para las manipulaciones de ADN fueron usadas según las

20 especificaciones de los suministradores.

Enzimas para manipulaciones de ADN

Excepto cuando se mencione de otra manera, todas las enzimas para las manipulaciones de ADN, como p. ej. endonucleasas de restricción, ligasas etc., se

25 obtuvieron de New England Biolabs, Inc.

Ensayo de la actividad fosfolipasa basada en el test NEFA-C:

Sustrato: L- α -lisofosfatidilcolina (Sigma).

30 Sustrato: Lecitina de soja (Sigma #P3644). Usado para medir la actividad fosfolipasa A.

Equipo de test Nefa-C es de Wako Chemicals Germany.

Tampón: 20 mM NaOAc pH 4,5

Solución del sustrato: 10 mg de sustrato en 1 mL Milli Q de agua y 1 mL de tampón (hacer suficiente solución del sustrato para todas las muestras).

35 1. Adición de 15 μ L de enzima a 150 μ L de solución del sustrato

2. Incubación durante 10 min. a 40°C

3. Transferencia de 30 μ L a 300 μ L de reactivo 1 (del equipo Nefa)

4. Incubación durante 10 min. a 37°C
5. Adición de 600 µl de reactivo 2 (del equipo Nefa)
6. Incubación durante 10 min. a 37°C
7. Medición de la absorción del producto de reacción final a 550 nm, según las instrucciones del equipo Nefa.

La actividad enzimática necesaria para producir 1 µmol de ácido graso por minuto de la reacción enzimática fue definida como 1 unidad.

Clonación por expresión en levadura

10. La clonación por expresión en levadura se realizó como está descrito exhaustivamente por H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260.; WO 93/11249; WO 94/14953), los cuales se incorporan en la presente por referencia.

15. Se realizaron todos los pasos individuales de extracción de ARN total, síntesis de ADNc, tratamiento de nucleasa de la judía mung, extremo romo con polimerasa T4 de ADN y construcción de bibliotecas según las referencias anteriormente mencionadas.

Procedimiento de fermentación de *Fusarium oxysporum* DSM No. 2672 para el aislamiento de ARNm:

20. El *Fusarium oxysporum* DSM No. 2672 fue cultivado en el medio YPD durante 4 días a 30°C. Se evaluaron 10 µl de sobrenadante para la actividad fosfolipasa en el ensayo de placa descrito abajo.

El ARNm fue aislado del micelio de este cultivo como se describe en H. Dalboege et al Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260.; WO 93/11249; y WO 94/14953.

25

Identificación de clones positivos de levadura (ensayo de placa):

Se realizó la identificación de clones positivos de levadura (es decir clones que comprenden una codificación del gen para una actividad fosfolipasa) como se describe a continuación.

30. Los transformantes de levadura se recubren de ágar SC con 2% de glucosa y se incuban durante 3 días a 30°C. Se coloca un filtro de acetato de celulosa (OE67, Schleicher & Schuell) encima de las células y posteriormente se transfiere a las placas que contienen ágar SC y 2% de galactosa con las células encima del filtro. Después de 3 días de incubación a 30°C, se transfiere el filtro con células a las placas del sustrato. Los clones positivos se identifican como colonias que producen una zona azul-verde en la placa del sustrato bajo la colonia.
- 35.

Las placas de sustrato se realizan de la manera siguiente: se añaden 2,5 g de ágar (BA-30 INA ágar®, Funakoshi Co. Ltd.) a 137,5 ml de H₂O, se calientan hasta hervir en un horno microondas. Después del enfriamiento a aproximadamente 60°C, se añade 30 ml de la mezcla siguiente: 62,5 ml 0,4 M de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y 50 ml 3% Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Alemania) disuelto en 2% de Tritón X-100 (v/v) y 0,5 ml 2% de solución verde brillante en H₂O. La concentración del sustrato es importante. Si la concentración es demasiado alta puede causar una actividad de base de las células de levadura y/o de lipasas fúngicas filamentosas con actividad fosfolipasa lateral.

10

Aislamiento de un gen de ADNc por expresión en *Aspergillus*:

Una colonia de levadura que produce fosfolipasa es inoculada en 20 ml de caldo de YPD en un tubo de ensayo de cristal de 50 ml. El tubo es agitado durante 2 días a 30°C. Las células son recogidas por centrifugado durante 10 min. a 3000 rpm.

15

El ADN es aislado según WO 94/14953 y disuelto en 50 ml de agua. El ADN es transformado en *E. coli* mediante procedimientos estándar. El ADN del plásmido es aislado de *E. coli* usando procedimientos estándar y analizado mediante un análisis de la enzima de restricción. El inserto de ADNc es cortado usando unas enzimas de restricción apropiadas y ligado a un vector de expresión *Aspergillus*.

20

Transformación de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus Niger*

Los protoplastos pueden prepararse como se describe en WO 95/02043, p. 16, línea 21 - página 17, línea 12, que se incorpora en la presente por referencia.

Se mezclan 100 µl de suspensión de protoplasto con 5-25 µg de ADN apropiado en 10 µl de STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Los protoplastos son mezclados con p3SR2 (un gen *A. nidulans* amdS que lleva plásmido). La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se añade 0,2 ml de 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ y 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 y se mezcla cuidadosamente (dos veces) y finalmente se añade 0,85 ml de la misma solución y se mezcla cuidadosamente. La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 25 minutos, se centrifuga a 2500 g durante 15 minutos y el granulado se resuspende en 2 ml de 1,2 M sorbitol. Después de una sedimentación más, los protoplastos se extienden en placas mínimas (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) con 1,0 M de sucrosa, pH 7,0, 10 mM de acetamida como fuente de nitrógeno y 20 mM de CsCl para inhibir el crecimiento residual. Tras la incubación durante 4-7 días a 37°C, las esporas son recogidas y extendidas para colonias únicas. Se repite este procedimiento y se

35

almacenar las esporas de una colonia única después del segundo reaislamiento como transformantes definidos.

Prueba de transformantes *A. oryzae* o *Aspergillus Niger*

5 Cada uno de los transformantes *A. oryzae* son inoculados en 10 ml de YPM (cf. abajo) y propagados. Tras 2-5 días de incubación a 30°C, se elimina el sobrenadante. Se agregan 20 µl de sobrenadante en agujeros troquelados en una placa de sustrato (véase arriba). Tras 1-24 horas, la actividad fosfolipasa aparece como una zona azul-verde alrededor del agujero.

10

Fermentación alimentada

La fermentación alimentada se realizó en un medio que incluye maltodextrina como fuente de carbono, úrea como fuente de nitrógeno y extracto de levadura. La fermentación alimentada se realizó mediante la inoculación de un cultivo en frasco de 15 agitación de las células huésped de *A. oryzae* en cuestión en un medio que incluye el 3,5% de la fuente de carbono y el 0,5% de la fuente de nitrógeno. Tras 24 horas de cultivo a pH 7,0 y 34°C, se inició el suministro continuo de fuentes de nitrógeno y carbono. Se mantuvo la fuente de carbono como factor de limitación y se aseguró que el oxígeno estuviera presente en cantidades excesivas. El cultivo de alimentación fue 20 continuado durante 4 días.

Aislamiento de la secuencia de ADN mostrada en la secuencia ID No. 1

La parte que codifica fosfolipasa de la secuencia de ADN mostrada en la codificación de la secuencia ID No. 1 para la fosfolipasa de la invención puede obtenerse 25 del organismo depositado *Escherichia coli* DSM 11299 mediante extracción del ADN del plásmido por métodos conocidos en la técnica (Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

Medios

30 YPD: adición de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, H₂O a 900 ml. Esterilizado en autoclave, 100 ml 20% de glucosa (filtrada estérilmente).

YPM: adición de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, H₂O a 900 ml. Esterilizado en autoclave, 100 ml 20% de maltodextrina (filtrada estérilmente).

10 x sal basal: 75 g de base nitrogenada de levadura, 113 g de ácido succínico, 68 35 g de NaOH, H₂O ad 1000 ml, filtrado estérilmente.

SC-URA: adición de 100 ml 10 x sal basal, 28 ml 20% de ácidos casamínos sin vitaminas, 10 ml 1% triptófano, H₂O ad 900 ml, esterilizado en autoclave, 3,6 ml 5% treonina y 100 ml 20% de glucosa o 20% de galactosa.

SC-agar: adición de SC-URA, 20 g/l ágar.

- 5 Ágar variante SC: 20 g de ágar, 20 ml 10 x sal basal, H₂O ad 900 ml, esterilizado en autoclave

PEG 4000 (polietilenoglicol, peso molecular = 4.000) (BDH, England)

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1

Fermentación de la fosfolipasa *Fusarium oxysporum*

Un cultivo de *Fusarium oxysporum*, DSM 2672, en una inclinación de agra, fue transferido a cinco frascos de agitación de 500 ml, cada uno con 100 ml del medio Bouillon-3 y agitado a 30°C durante 1 día (200 rpm, amplitud 2,5 cm).

- 15 La composición del medio Bouillon-3 es la siguiente:

Peptona	6 g/l
Caseína tripsina digerida	4 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
Extracto de carne	1,5 g/l
20 Glucosa	1 g/l

El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 40 minutos.

El caldo de cultivo de estos frascos de agitación de Bullion-3 fue usado como un cultivo de semilla para inocular veinte frascos de agitación de 500 ml, cada uno con 200 ml de medio PL-1.

- 25 La composición del medio PL-1 es la siguiente:

Peptona	10 g/l
Tween®-80	12 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l
30 pH antes del autoclave	6,0

El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 40 minutos.

- Cada frasco de agitación de PL-1 fue inoculado con 0,5-2 ml de caldo del cultivo Bouillon-3 y agitado a 200 rpm (amplitud 2,5 cm) a 30°C durante 5 días. El caldo de cultivo de los frascos de agitación fue agrupado en cosecha, sumando 3,9 l con un
35 rendimiento enzimático de 53 LU/ml.

Ejemplo 2

Purificación de la fosfolipasa

Fase 1) un litro de sobrenadante de fermentación fue centrifugado y el precipitado resultante descartado. El sobrenadante fue posteriormente ajustado a 0,8 M de acetato de amonio añadiendo acetato de amonio sólido.

Fase 2) - Cromatografía hidrofóbica - butilo Toyopearl matriz de 650 C fue comprada de Toso Hass (Röhm y Haas company, Germany). Una columna de cincuenta ml fue embalada con la matriz. La columna fue lavada con 50 % de etanol y posteriormente con agua. La columna fue luego equilibrada con 0,8 M de acetato de amonio. El sobrenadante de la fermentación ajustado con 0,8 M de acetato de amonio fue posteriormente aplicado en la columna. El material desenlazado fue luego lavado con 0,8 M de acetato de amonio hasta que se eliminó todo el material absorbente UV (280 nm).

La columna fue entonces eluida con agua y posteriormente con 50% de etanol.

La actividad fosfolipasa fue determinada a pH 4,5 y 40°C usando un equipo NEFA como se ha descrito anteriormente. Se agruparon las fracciones que contienen una actividad en agua y eluato de alcohol. Se evaluó la actividad a pH 4,5 usando un ensayo del equipo NEFA.

Las fracciones que contienen una actividad fosfolipasa fueron posteriormente agrupadas y dializadas y concentradas usando una membrana de ultrafiltración Amicon con un corte de 10 kDa.

Fase 3) Absorción negativa en cromatografía DEAE de flujo rápido.

DEAE FF se compró de Pharmacia y una columna de 50 ml fue embalada con la matriz.

La columna fue posteriormente lavada como se ha descrito por el fabricante y equilibrada con 25 mM tampón acetato Tris pH 7.

La muestra dializada y concentrada fue entonces ajustada a pH 7 y la conductancia a 2 mSi y aplicada en una columna de intercambiador aniónico DEAE FF.

La actividad fue recogida como efluente. La actividad no enlaza con el intercambiador aniónico a pH 7.

El efluente de DEAE FF con actividad fue concentrado y dializado usando una membrana Amicon con un corte de 10 kDa. y tampón 25 mM tampón de acetato sódico pH 6.

Gelfiltración en Superdex 75.

Una columna preempaquetada Superdex 75 Hiloal Tm 16/60 de Pharmacia fue lavada y equilibrada con 25 mM de acetato sódico pH 6 con 150 mM NaCl.

Dos ml del efluente concentrado de intercambiador aniónico que presenta actividad fosfolipasa a pH 4,5 y 40 grados fueron aplicados en la columna superdex.

La actividad fue separada por filtración en gel con una velocidad de flujo de 1 ml /minuto.

Ejemplo 3

5 Caracterización de la fosfolipasa purificada obtenida de *Fusarium oxysporum*

Una caracterización, como se describe abajo, fue realizada en una fosfolipasa *Fusarium oxysporum* fermentada como se describe en el ejemplo 1 y purificada como se describe en el ejemplo 2.

10 El peso molecular de la enzima de la fosfolipasa fue determinada usando de 4 a 20 % de placas profundidas del sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacríamida de Novex Tm.

El peso molecular de la proteína fue determinado bajo condiciones de reducción que se han descrito anteriormente.

15 Para la fosfolipasa *F. oxysporum* el peso molecular resultó ser de 29-30 kDa bajo condiciones de reducción.

El punto isoeléctrico fue determinado mediante el uso de placas Ampholine PAGE de Pharmacia.

Para el *F. oxysporum* pI de la proteína resultó ser alrededor de pH neutral, preferiblemente en el margen 5,8 a 6,8.

20

Termostabilidad de la fosfolipasa

La termostabilidad de la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* fue evaluada mediante calorimetría por DSC (Calorimetría diferencial por barrido). La temperatura de desnaturalización térmica, Td, fue tomada como tope del valor máximo de la
25 desnaturalización en termogramos (Cp vs. T) obtenida después del calentamiento de las soluciones enzimáticas a un nivel de calentamiento programado y constante.

Experimentos:

Para los experimentos se utilizó una DSC II de Hart Scientific (Utah, US, 1993).

30 Se usaron soluciones tamponadas de 50 mM como solvente para la enzima (aproximadamente 2 mg/ml) a pH 10 (50 mM de tampón de glicina), pH 7 (50 mM tampón HEPES +10 mM EDTA) o pH 4 (50 mM fr tampón de citrato). La enzima fue purificada según el ejemplo 2 anterior.

35 Se transfirieron 750 µl de solución enzimática en unas ampollas hastelloy selladas estándar de 1 ml de Hart Scientific.

Las ampollas fueron cargadas en el calorímetro y enfriadas a 5°C durante 15 min. El equilibrio térmico se efectuó antes del barrido de DSC. El barrido de DSC fue realizado

de 5°C a 95°C a una frecuencia de barrido de aproximadamente 90 K/hr. Las temperaturas de desnaturalización fueron determinadas a una exactitud de aproximadamente +/- 2°C.

5 Resultados:

Tabla No 1: Tope hasta el valor máximo de desnaturalización como función de pH

	pH	Td(°C)
10	4	57°C
	7	62°C
	10	55°C

Debería observarse que estos experimentos fueron realizados en ausencia de una matriz de aceite que puede influir significativamente en la estabilidad enzimática. Los resultados de la DSC indican una estabilidad máxima cerca del pH neutral.

Asumiendo la desnaturalización térmica irreversible, una temperatura relevante del rendimiento en una aplicación industrial como el desgomado de aceites (US 5.264.367) es al menos aproximadamente 10 grados inferior a las temperaturas Td incluidas en la tabla No 1 anterior.

20

Secuencia aminoterminal

Un análisis aminoterminal fue determinada usando la degradación Edman con el equipo Applied Biosystem (secuenciador de proteínas ABI 473A, Applied Biosystem, USA) realizado como el fabricante describe.

25 Secuencia(s) N-terminal:

Para la fosfolipasa *F. Oxysporum*, la secuencia N-terminal es:

N-terminal A-V-G-V-T-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

El aminoácido N-terminal "A" (Ala) se encuentra en la posición 31 de la secuencia ID No. 2. Esto indica que la enzima fosfolipasa madura de la invención comienza en la posición 31 de la secuencia ID No 2.

30

Consecuentemente, la secuencia madura se encuentra en 31-346 de la secuencia ID No 2.

Ejemplo 4

35 **Actividad fosfolipasa A**

La actividad fosfolipasa A fue determinada con Lecitina de soja como sustrato en el modo descrito anteriormente (ensayo con bases de prueba NEFA) a pH 4,5 a 40°C.

La fosfolipasa *F. oxysporum* mostró una actividad fosfolipasa A significativa en las condiciones anteriormente descritas.

Ejemplo 5**Actividad hacia L- α -lisofosfatidilcolina**

La actividad fosfolipasa fue determinada con L- α -lisofosfatidilcolina como sustrato en el modo descrito anteriormente (ensayo con bases de prueba NEFA) a pH 4,5 a 40°C.

La fosfolipasa de *F. oxysporum* muestra una actividad significativa contra L- α -lisofosfatidilcolina en las condiciones anteriormente descritas.

Ejemplo 6**10. Actividad fosfolipasa en disposición monomolecular**

Se ha usado un equipo monomolecular (cuba de orden cero, KSV5000, instrumentos KSV, Finlandia) para valorar la actividad de varias enzimas hacia el fosfolípido DDPC (Di Dicanol (C10) Fosfatidil Colina).

15 Experimentos

En una superficie íntegramente purificada de una solución tampón (10 mM TRIS, pH 8,0, 25°C), se extendió una capa monomolecular de DDPC de una solución de cloroformo. Después de la relajación de la capa monomolecular (evaporación del cloroformo), la presión de la superficie se ajusta a 15 mN/m, correspondiente a una área media molecular de DDPC de aproximadamente 63 Å²/molec. Una solución tampón (véase arriba) con aproximadamente 60 µg (micro gramo) de enzimas se inyecta a través de la capa monomolecular en la subfase del compartimiento de la reacción (cilindro con área 1520 mm² y volumen 30400 mm³) en el "cuba de orden cero". la actividad enzimática se manifiesta a través de la velocidad de una barrera móvil que comprime la capa monomolecular con el objetivo de mantener la presión constante de la superficie, mientras las moléculas del sustrato insolubles son hidrolizadas en unos productos reactivos más hidrosoluble. Después de haber verificado que la solubilidad acuosa de los productos reactivos (ácido cáprico y DDPC) es considerablemente superior que para DDPC, se estima el número de moléculas DDPC hidrolizadas por minuto por la enzima de la área media molecular (MMA) de DDPC.

Resultados

Tabla 2. Actividad de enzimas hacia DDPC en una disposición de la capa monomolecular.

Enzima	Actividad (nmol/min) *
Sigma P9279 (PLA2 de veneno de abeja, 850 U/mg)	1,9
Enzima de <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
Lipasa de componente <i>Candida antarctica</i> B	0
Lipasa de componente <i>Candida antarctica</i> A	0

Lipasa pancreática recombinante del conejillo de indias (rGPL)	0,2
Lipolase®(Novo Nordisk A/S)	< 0,1

*) Calculado de la reducción en la área de la capa monomolecular por unidad de tiempo inducida por la presencia de la enzima.

"Enzima de *F. Oxysporum*" en la tabla 2 es una fosfolipasa de la invención, purificada como se describe en el ejemplo 2.

5

Conclusión

Ninguna actividad fosfolipasa fue detectada para la mayor parte de las enzimas excepto para las lipasas obtenidas de la lipasa del conejillo de indias, la cual mostró una actividad fosfolipasa mínima.

10

Fosfolipasa de la invención obtenida de *Fusarium oxysporum* mostró sorprendentemente una actividad fosfolipasa menor.

15

Consecuentemente, en la presente invención el término "actividad fosfolipasa", usado aquí en conexión con una fosfolipasa de la invención, se define como una actividad que, en el "ensayo monomolecular fosfolipásico" mostrado anteriormente, es al menos 0,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg; más preferiblemente al menos 0,40 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg; más preferiblemente al menos 0,75 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg; más preferiblemente al menos 1,0 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg; más preferiblemente al menos 1,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg; e incluso más preferiblemente al menos 1,5 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg.

20

En consecuencia, el término "lipasa con actividad fosfolipasa lateral" se define como una lipasa con una actividad fosfolipasa lateral, donde la actividad fosfolipasa lateral, en el "ensayo monomolecular fosfolipásico" mostrado en el ejemplo 6, es inferior a las figuras mencionadas anteriormente que especifican actividad fosfolipasa.

25

Un ejemplo de una lipasa con actividad fosfolipasa lateral según estas definiciones es la lipasa del conejillo de indias mostrada en la tabla 2 anterior.

Dicha lipasa del conejillo de indias tiene una actividad fosfolipasa lateral en el "ensayo monomolecular fosfolipásico" que es inferior a 0,25 nmol/min, dosis enzimática: 60 µg.

30

Ejemplo 7

Clonación y expresión de una fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* DSM No. 2672

Se realizó una clonación y expresión usando la clonación por expresión en la técnica de levadura en el modo descrito anteriormente.

El ARNm fue aislado de *Fusarium oxysporum*, DSM No. 2672, cultivado en el modo descrito anteriormente que incluye agitación para asegurar una aireación suficiente. Los micelios fueron recogidos después de 3-5 días de crecimiento, inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Una biblioteca de *Fusarium oxysporum*, DSM No. 2672, consistente en aproximadamente 9×10^5 clones individuales, fue construida en *E. coli* como se describe con una base del vector de 1%. El ADN del plásmido de algunos depósitos fue transformado en levadura y se obtuvieron 50-100 placas que contienen 250-400 colonias de levadura de cada agrupación.

Colonias de la fosfolipasa positiva fueron identificadas y aisladas en placas de sustrato (véase arriba). Insertos de ADNc fueron amplificados directamente de las colonias de levadura y caracterizadas como se describe en la sección Materiales y Métodos anterior. La secuencia de ADN del ADNc que codifica fosfolipasa se muestra en la secuencia ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la secuencia ID No. 2. En la secuencia ID No. 1, los nucleótidos de ADN del No 23 al No. 1060 define la región que codifica fosfolipasa. La parte de la secuencia de ADN en la secuencia ID no 1, que codifica la parte madura de la fosfolipasa, consta de las posiciones 113 a 1060, las cuales corresponden a las posiciones de aminoácidos 31-346 en la secuencia ID no 2.

El ADNc puede obtenerse del plásmido en DSM 11299.

El ADN total fue aislado de una colonia de levadura y el ADN del plásmido salvado mediante transformación del *E. coli* en el modo descrito anteriormente.

Con el objetivo de expresar fosfolipasa en *Aspergillus*, el ADN fue digerido con enzimas de restricción apropiadas, su tamaño fraccionado en gel, y un fragmento correspondiente a los genes de la fosfolipasa purificados. El gen fue posteriormente ligado a pHD414, digerido con enzimas de restricción apropiadas, dando como resultado el plásmido pA2PH10.

Después de la amplificación del ADN en *E. Coli*, el plásmido fue transformado en *Aspergillus oryzae* en el modo descrito anteriormente.

30 Prueba de transformantes *A. oryzae*

Cada uno de los transformantes fueron evaluados para una actividad enzimática en el modo descrito anteriormente. Algunos transformantes tenían una actividad fosfolipasa que era significativamente más alta que la base de *Aspergillus oryzae*. Esto demuestra una expresión eficaz de la fosfolipasa en *Aspergillus oryzae*.

35 Ejemplo 8

Expresión recombinante de una fosfolipasa *F. oxysporum*

Un transformante *A. orizae* que incluye el vector de expresión *Aspergillus* pA2PH10 (véase ejemplo 7) fue fermentado en discontinuo como se ha descrito anteriormente. La purificación de la fosfolipasa *F. oxysporum* producida recombinantemente fue realizada como se describe en el ejemplo 2.

5

Ejemplo 9

Caracterización de una fosfolipasa expresada recombinantemente y purificada obtenida de *Fusarium oxysporum*

La caracterización fue realizada en una fosfolipasa *Fusarium oxysporum* expresada recombinantemente y purificada posteriormente (véase ejemplo 8).

10

Estos resultados de caracterización respecto a la fosfolipasa de *F. oxysporum* recombinante de la invención correlacionaba perfectamente con los resultados de la caracterización mostrados en el ejemplo 3, donde se demostró que la enzima expresada recombinantemente y purificada fue la misma que la fosfolipasa no expresada recombinantemente y purificada caracterizada en el ejemplo 3.

15

Ensayos generales usados para caracterizar una fosfolipasa producida recombinantemente obtenida de *F. oxysporum*

Ensayos de la fosfolipasa:

20

La actividad fosfolipasa (PHLU) fue medida como la liberación de ácidos grasos libres de lecitina. Se añadió 50 µl 4% L-alfa-fosfatidilcolina (lecitina de planta de Avanti, USA), 4% Tritón X-100, 5 mM CaCl₂ en 50 mM HEPES, pH 7 y se diluyó 50 µl de solución enzimática en una concentración apropiada en 50 mM HEPES, pH 7. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 30°C y la reacción terminada a 95°C durante 5 minutos antes del centrifugado (5 minutos a 7000 rpm). Los ácidos grasos libres fueron determinados usando el equipo NEFA C de Wako Chemicals GmbH; 25 µl de mezcla reactiva a 250 µl de reactivo A fueron añadidos e incubados durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se añadió 500 µl de reactivo B y la muestra fue incubada nuevamente, 10 minutos a 37°C. La absorción fue medida a 550 nm usando un espectrofotómetro de la ordenación de diodos HP 8452A. Las muestras fueron realizadas al menos en duplicados. Se incluyeron el sustrato y las capas enzimáticas (muestras de enzimas precalentadas (10 minutos a 95°C) + sustrato). El ácido oleico fue usado como un estándar del ácido graso. 1 PHLU equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graso libre/min bajo estas condiciones.

25

30

35

De forma alternativa, se realizó el ensayo a 37°C en 20 mM tampón de citrato, pH 5 (Ca²⁺-dependencia) o 20 mM de tampón Britton-Robinson (pH-perfil/temperatura-perfil/estabilidad).

La actividad fosfolipasa A1 (PLA1) fue medida usando 1-(S-décanoil)-2-decanoil-1-tio-sn-glicero-3-fosfocolina (sondas moleculares D3761) como sustrato. Se añadió 190 µl de sustrato (100 µl D3761 (2 mg/ml en etanol) + 50 µl 1 % Tritón X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl₂, pH 7) en una cubeta de 200 µl a 10 µl de enzima, y la absorción a 410 nm fue medida como función de tiempo en el espectrofotómetro de ordenación de diodos HP 8452A a temperatura ambiente. La actividad fue calculada como la inclinación de la curva en el margen lineal. PLA1 equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graso libre (tiol)/min bajo estas condiciones.

La actividad fosfolipasa A2 (PLA2) fue medida a 40°C usando 1-hexadecanoil-2-(1-pirenodecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina (sondas moleculares H361). Se añadió 2 ml de sustrato (50 µl 1% Tritón X-100 + 25 µl 0,1% H361 en metanol + 10 ml 50mM HEPES, pH 7) en una cubeta de 2 ml con agitación a 10 µl de enzima, y se midió la emisión de la fluorescencia del pireno a 376 nm (excitación a 340 nm) como función de tiempo (intervalos de 1 seg.) usando el aparato Perkin Elmer LS50. En el Tritón X-100/micelas fosfolípidas, la concentración de fosfolípido fue ajustada para tener una formación excímera (emite a 480 nm). Después de la disociación, el ácido graso en la posición 2, el cual contiene el grupo pireno, es liberado en la fase acuosa dando como resultado un aumento de la emisión del monómero. PLA2 fue tomado como la inclinación de la curva en el margen lineal en condiciones iguales.

Ensayos de lipasa:

La actividad lipasa (LU) fue medida según la publicación de Novo Nordisk AF 95. La hidrólisis de tributirino a 30°C a pH 7 fue seguido por un experimento de valoración de pH-stat. 1 LU equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido butírico/min bajo condiciones estándar.

La actividad en aceite de oliva (SLU) fue medida de la manera siguiente: se añadieron 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9 a 2,5 ml de sustrato de la lipasa sigma. El pH fue ajustado a pH 9 antes de añadir 0,5 ml de solución de lipasa (diluida en tampón) y llevar a cabo un ensayo de valoración de pH-stat a 30°C usando el Titralab disponible comercialmente de Radiometer A/S, Copenhagen, Dinamarca. 1 SLU equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graso libre/min a pH 9, 30 °C.

Caracterización de una fosfolipasa *F. oxysporum* producida recombinantemente de la invención

Los ensayos usados para caracterizar las enzimas que se mencionan a continuación fueron los ensayos descritos anteriormente.

Enzimas:

PL de *Fusarium oxysporum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la
5 secuencia no 2.

Lote F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), pureza > 95 % (sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacrimida).

La enzima fue expresada recombinantemente y purificada en el modo descrito anteriormente.

10 Lecitase™ Lote L546-F06 (10368 IU/ml, aproximadamente 20 mg/ml)

Lipolase® (Novo Nordisk A/S)

Se investigó la influencia de Ca²⁺ en la actividad fosfolipasa de la lipasa/fosfolipasa *F. Oxysporum*. No se observó ninguna diferencia significativa tanto si EDTA o Ca²⁺ estaba incluido en el ensayo o no (véase tabla 3 a continuación), y así la
15 enzima parece ser relativamente independiente de Ca²⁺.

Tabla 3

La dependencia de la actividad fosfolipasa *F. oxysporum* (PHLU) sobre EDTA y CaCl₂ - 2% Lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM citrato, pH 5 a 37°C.

20

	5 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂
Actividad relativa ¹	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89

¹La actividad relativa es relativa a la actividad en 1 mM CaCl₂, la cual está normalizada en 1.

Se estudió el perfil de pH en el tampón Britton-Robinson usando la lecitina de planta como sustrato (tabla 4). Aunque la enzima muestra un perfil de pH alcalino sobre
25 fosfolípido con un óptimo a pH 9 o más alto, la actividad es aún suficientemente alta para proporcionar el desgomado de aceites a un rendimiento y pH bajo en la cocción (véase a continuación para una comparación de actividades específicas).

Tabla 4

30 El perfil de pH de la fosfolipasa *fusarium oxysporum* 2% Lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM BR, 37 °C.

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Actividad relativa ¹	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

¹La actividad relativa es relativa a la actividad a pH 9, la cual está normalizada a 1.

Se obtuvieron los perfiles de temperatura para la fosfolipasa a pH 5; la actividad comienza a declinar a temperaturas superiores a 40°C (tabla 5). Esto concuerda razonablemente con la estabilidad de la temperatura medida mediante la preincubación de la enzima y medición posterior de la actividad residual (tabla 6), donde la enzima es estable a temperaturas de hasta 45°C a pH 5.

Tabla 5

Perfil de temperatura de la fosfolipasa *F. oxysporum* 2% Lecitina, 2% Tritón X-100, 20 mM BR.

	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

Todos los datos se muestran como datos de la actividad relativa, relativos a la actividad a pH 5, 40 °C, la cual está normalizada a 1.

Tabla 6

Estabilidad de temperatura de la fosfolipasa *F. oxysporum*; preincubación 30 minutos en 20 mM BR

	5 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Todos los datos se muestran como datos residuales de la actividad, donde la actividad después de la preincubación a 5°C está normalizada a 1.

La estabilidad baja de la enzima puede ser ventajosa para registrar un producto eventual como un proceso auxiliar, ya que la enzima activa no debería estar presente en el producto final en el desgomado de aceites comestibles o productos horneados.

La fosfolipasa obtenida de *Fusarium oxysporum* de la invención tiene tanto actividad fosfolipasa como lipasa.

En consecuencia, se investigó la actividad de la enzima en varios sustratos de lipasa y de la fosfolipasa y se comparó con la actividad de la fosfolipasa Lecitase™ disponible comercialmente y de la lipasa Lipolase® disponible comercialmente (Novo Nordisk A/S).

La lipasa/fosfolipasa de *F. oxysporum* tiene una alta actividad tanto en el aceite de tributirino como en el aceite de oliva a pH 7 y 9 (tabla 7). Por razones comparativas la actividad específica de Lipolase® es alrededor de 5000 LU/mg. No obstante, contrariamente a Lipolase®, la lipasa de *F. oxysporum* presenta una especificidad mucho más amplia con actividad fosfolipasa considerable y también actividad tioesterasa (véase el ejemplo 6 de la capa monomolecular anterior, el cual muestra que Lipolase® no tiene una actividad fosfolipasa que pueda medirse).

La fosfolipasa *F. oxysporum*/lipasa de la invención tiene una actividad específica en lecitina considerablemente superior a la de la fosfolipasa Lecitase™ (PLA2 pancreática del cerdo) a pH 7 (tabla 7).

- 5 Comparada con Lecitase™, la enzima *F. oxysporum* tiene una actividad de 100 pliegues más alta a pH 7. La proporción fosfolipasa:lipasa para la enzima *F. oxysporum* es alrededor de 0,225 (1000 LU/mg / 225 PHLU/mg) bajo condiciones similares (pH 7 y 30 °C).

Tabla 7

- 10 Actividad de lipasa *F. oxysporum*/fosfolipasa - comparación a Lecitase™.

Enzima	LU/mg	PLU ¹ /mg	PHLU/mg	SLU/mg	PLA1/m
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase	< 0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

¹PLU fue medido como PHLU pero en 20 mM de citrato, pH 5 y a 37°C en lugar de 50mM HEPES, pH 7 a 30 °C

- 15 La especificidad de la lipasa *F. oxysporum*/fosfolipasa fue investigada usando sustratos específicos para la fosfolipasa A1; midiendo la disociación del enlace tio-éster en la posición 1 de 1-(S-decanoil)-2-decanoil-1-tio-sn-glicero-3-fosfocolina.

La enzima hidroliza claramente la posición 1 en fosfolípido (tabla 7), mientras que Lecitase™ (PLA2 pancreática del cerdo) no mostró ninguna actividad en este sustrato tal como se esperaba.

- 20 Secuencia de aminoácidos C-terminal de la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* de la invención.

- La secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína de la fosfolipasa madura expresada recombinantemente se determinó como se describe en el ejemplo 3, y se confirmó que esta secuencia N-terminal era la misma que la que se determinó para la 25 enzima purificada y producida de manera no recombinante (véase ejemplo 3).

La espectrometría de masas MALDI-TOF se efectuó usando un espectrómetro de masa VG ToFSpec (Micromass, Manchester, UK) como se describe en Christgau et al. Biochem. J. 319, 705-712, 1996.

- 30 Antecedentes

- La secuencia de aminoácidos N-terminal de la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*, tal como se deduce de la secuencia de ADN, proporciona en combinación con la secuencia de aminoácidos N-terminal conocida de la fosfolipasa madura, una proteína de 315 residuos aminoácidos (Aminoácidos 31-346 en la secuencia ID no. 2). La 35 masa teórica de esta proteína pronosticada es de 33.256,8 Da.

Usando una espectrometría de masas MALDI-TOF hemos determinado previamente que la masa de la fosfolipasa/lipasa auténtica de *F. oxysporum* es 28,2 kDa (datos no mostrados), y en el sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacríamida se mostró que el peso molecular es de 29-30 kDa (véase arriba).

5 Como las secuencias de aminoácidos N-terminal de las lipasas auténticas y recombinantes de *F. oxysporum* son idénticas, es posible que la diferencia de la masa observada entre la masa pronosticada y la masa experimental esté provocada por el tratamiento de C-terminal.

10 Para investigar este hecho, hemos aislado el péptido C-terminal de lipasa recombinante de *F. oxysporum* expresado en *A. oryzae* y ordenado a través de su C-terminal.

Estrategia

15 La masa media de la fosfolipasa/lipasa auténtica de *F. oxysporum* de 28,2 kDa puede utilizarse para pronosticar el residuo C-terminal más posible que viene a ser Ser303 (secuencia ID No 2).

Esta deducción se basa en la suposición de que la enzima no está glucosilada. El único sitio N-glicosilación potencial encontrado en la secuencia en Asn163 probablemente no se utiliza, ya que se ha encontrado un Pro-residuo en la posición 164. 20 No se ha informado nunca sobre la presencia de un Pro-residuo como segundo residuo en la secuencia de consenso para N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Tr). Además, la forma del valor máximo en el espectro de la masa no indica glicosilación. No obstante, el valor máximo es más amplio que el normalmente encontrado para las proteínas homogéneas, lo que indica la posibilidad de una heterogeneidad del tamaño. Como el N-terminus de la 25 enzima está bien definido, la heterogeneidad del tamaño tiene muy posiblemente su base en el tratamiento heterogéneo de C-terminal.

La inspección de la secuencia ID no 2 (ver abajo) revela que el C-terminus pronosticado está localizado cerca del último de los 8 residuos de Cis en la secuencia. La introducción de una marca radioactiva en los residuos de Cis hace posible que los 30 péptidos con residuos de Cis sean fácilmente encontrados a través de la purificación del péptido. La combinación del marcaje radioactivo con la degradación proteolítica, usando la proteasa Asp-N que se disocia delante de los residuos Asp, daría como resultado un péptido marcado C-terminal. Además, tres péptidos internos estarían marcados. La secuenciación de todos los péptidos marcados deberían revelar el C-terminus de la 35 enzima.

31 AVGVTTTDFS NPKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSMNG CPTVQNGAT 80
 81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSINIRNWLTL NLDPGQEDCS 130
 131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFNVIS TGHSLGGAVA 180
 181 VLAAANLRVG GTPVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230
 231 PRLPPLIPGY RHTTPEFWLS GGGGDKVDYT ISDVKVCEGA ANLGCNGCTL 280
 281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GFSWRRYRSA ESDVKRATMT DAELEKKLNS 330
 331 YVQMDKEYVK NNQARS 346

Secuencia ID no 2: Secuencia pronosticada de aminoácidos de fosfolipasa/lipasa de *F. Oxysporum*.

- 5 La secuencia se deduce de la secuencia de ADN y comienza en el N-terminus determinado experimentalmente para tanto la enzima auténtica como la enzima recombinante. Los 8 residuos de Cis están indicados por ↓↓ mientras el residuo Ser de C-terminal pronosticado de la espectrometría de masas MALDI-TOF de la enzima auténtica está indicado por ↑. El residuo Asn encontrado en la secuencia de consenso para N-glicosilación (NXS/T) está mostrado por (O) pero cuando no se utiliza con toda probabilidad mientras X es un Pro-residuo.
- 10

Resultados experimentales

- 15 La enzima era PL de *Fusarium oxysporum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia no 2.

Lote F-9700989, OD280 0,83 (0,69 mg/ml), pureza > 95 % (sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacrimida).

La enzima fue expresada recombinantemente y purificada en el modo descrito anteriormente.

- 20 La enzima fue desnaturalizada y los enlaces disulfuro reducidos antes de que los grupos tiol reaccionaran con I[1-¹⁴C]CH₂CONH₂.

Siguiendo el marcaje radioactivo de los residuos de Cis, la lipasa fue degradada usando la proteasa Asp-N.

10 A continuación se presenta un resumen de los resultados. Este esquema puede parecer caótico debido a las muchas secuencias presentadas. No obstante, el esquema contiene todos los datos de secuencia obtenidos de las fracciones radioactivas y, así, representa la base para la conclusión. Debe observarse que todos los residuos de Cys han sido recubiertos a través de la secuenciación; la mayor parte de éstos más de una vez. Otra cuestión a precisar son las divisiones aberrantes observadas, las cuales dan como resultado un gran número de pequeños péptidos marcados radioactivamente.

346

Las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante la secuenciación de los péptidos marcados radioactivamente se derivaron de la enzima *F. oxysporum* recombinante. Las secuencias están alineadas a la secuencia de aminoácidos pronosticada como se deduce de la secuencia de ADN. Los 8 residuos de Cis están indicados por ↓ mientras que el residuo Ser de C-terminal pronosticado a partir de la espectrometría de masas MALDI-TOF de la enzima auténtica está indicado por ↑.

Conclusión experimental

De la secuenciación de todos los péptidos marcados radioactivamente está claro que la parte C-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada en el ADN es procesada durante la expresión de la lipasa *F. oxysporum*. Las secuencias péptidicas apuntan a Ser303 como el residuo C-terminal más probable en la enzima madura, según el resultado de la espectrometría de masas MALDI-TOF.

No obstante, basándose en los datos no puede descartarse que ocurra el tratamiento diferencial de C-terminal llevando a C-terminales heterogéneos; p. ej. un péptido indica que Fe272 podría también encontrarse como residuo C-terminal.

Ejemplo 10

Descripción general del ensayo para el desgomado enzimático de aceite comestible

Equipo para realizar el desgomado enzimático

El equipo consiste en un 1 l de reactor de acero con chaqueta exterior ajustado con una tapa de acero, un propulsor (600 rpm), deflectores, un sensor de temperatura, un tubo de entrada en la parte superior, un refrigerante de reflujo (4°C) en la parte superior y un tubo de salida en la parte inferior. La camisa exterior del reactor está conectada a un baño de termostato. El tubo de salida está conectado por medio de un tubo de silicona a la parte superior del mezclador en línea Silverson equipado con un "tamiz de alto cizallamiento de agujeros cuadrados", accionado por un mezclador de laboratorio de alto cizallamiento Silverson L4RT (8500 rpm, flujo ca. 1.1 l/minuto). La parte superior del mezclador está ajustada con un serpentín de enfriamiento (5-10 °C) y un tubo de salida, el cual está conectado al tubo de entrada del reactor por medio del tubo de silicona. Un sensor de temperatura está insertado en el tubo de silicona justo después de la parte superior del mezclador. La única conexión del sistema de la parte superior del reactor/mezclador a la atmósfera es a través del condensador de reflujo.

Procedimiento general para realizar el desgomado enzimático

Se enciende todo equipo de termostato y de enfriamiento. Entonces se agregan 0,6 l (ca. 560 g) de aceite en el reactor, el cual se mantiene aproximadamente a la

temperatura necesaria para el experimento específico. Se enciende el mezclador de laboratorio y, de esta manera, el aceite comienza a circular del reactor a la parte superior del mezclador y otra vez al reactor. Se deja que el sistema se equilibre durante aproximadamente 10 minutos, periodo durante el cual se sintoniza con precisión la temperatura. El período de pretratamiento comienza con la adición de 0,6 g (2,86 mmol) de monohidrato de ácido cítrico en 27 g MilliQ de agua (agua añadida vs. aceite equivale a 4,8% peso/peso; [ácido cítrico] en fase acuosa = 106 mM, en emulsión de agua/aceite = 4,6 mM), que define $t = 0$. Cuando $t = 30$ minutos, se añade una cantidad adecuada de solución 4 M de NaOH:

10	0,0 equiv. 4 M NaOH	→pH 3,7
	1,0 equiv. 4 M NaOH (0,714 ml)	→pH 4,5
	1,5 equiv. 4 M NaOH (1,07 ml)	→pH 5,0
	2,0 equiv. 4 M NaOH (1,43 ml)	→pH 5,5
	2,5 equiv. 4 M NaOH (1,79 ml)	→pH 6,2
15	3,0 equiv. 4 M NaOH (2,14 ml)	→pH 8,0

Cuando $t = 35$ minutos, las muestras son extraídas para el análisis de P y determinación del pH. Inmediatamente después, se añade la cantidad requerida de solución enzimática (final del periodo de pretratamiento). Las muestras para el análisis de P y determinación del pH son extraídas cuando $t = 1, 2, 3,5, 5, 6$ horas y, entonces, termina la reacción. El sistema del reactor/mezclador es vaciado y enjuagado con 2x500 ml 10% solución de agua DI/Deconex seguida por un mínimo 3x500 ml de agua DI. La tabla 8 es una presentación de las diferentes adiciones y muestras durante la reacción.

Tabla 8. Horario para el desgomado enzimático

Tiempo	Adición de	Muestra	
		Análisis de P	Determinación del pH
0	Ácido cítrico	X	
5 min.			X
30 min.		X	X
30 min. + δ min.	NaOH		
35 min.		X	X
35 + δ min.	Enzima		
1 hora		X	X
2 horas		X	X
3,5 horas		X	X
5 horas		X	X
6 horas		X	X

Análisis del fósforo:

Muestra para el análisis de P:

Coger 10 ml de agua en emulsión de aceite en un tubo de centrifugado de vidrio. Calentar la emulsión al baño maría durante 30 minutos. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Transferir aproximadamente 8 ml de fase superior (de aceite) a un 12 ml de tubo de poliestireno y dejar (reposar) durante 12-24 horas. Después del reposo, tomar
5 aproximadamente 1-2 g de la fase clara superior para el análisis del P.

El análisis de P se efectuó según el procedimiento 2,421 de "*Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives*, 7th ed. (1987)":

Pear. 100 mg de MgO (leicht, Merck #5862) en un plato de porcelana y calentar con un mechero de gas. Añadir 1-2 g de aceite y encender con un mechero de gas para
10 producir una masa negra y dura. Calentar en un horno Vecstar a 850°C durante 2 horas para producir las cenizas blancas. Disolver las cenizas en 5 ml de 6 M HNO₃ y añadir 20 ml de mezcla del reactivo. Dejar durante 20 minutos. Medir la absorbencia a 460 nm (usar un ensayo en vacío (5 ml HNO₃ + 20 ml mezcla de reactivos) para la regularización cero). Calcular mediante el uso de la curva de calibración.

15 Determinación del pH

Coger 2 ml de agua en la emulsión de aceite y mezclar con 2 ml de agua MilliQ. Después de la separación de la fase, pipetar la capa superior del aceite. Medir el pH en la fase acuosa con electrodo de pH Orion. Las medidas se transforman en valores "reales" de pH por la fórmula

$$20 \quad \text{pH}_{\text{real}} = \text{pH}_{\text{medido}} - 0,38.$$

Una curva de calibración se obtuvo mediante la disolución de 0,6 g de monohidrato de ácido cítrico en 27 g de agua DI; el pH de esta solución fue medido por el electrodo de pH Orion (pH_{real}). Se mezclaron 100 µl con 2 ml de agua MilliQ, y se midió el pH de esta solución por el electrodo de pH Orion (pH_{medido}). El pH de la solución de ácido
25 cítrico fue gradualmente cambiando mediante la adición de una solución NaOH y, para cada regularización, se realizaron la dilución y medidas del pH en el modo descrito anteriormente).

Ejemplo 11

30 **Condiciones óptimas del desgomado para Lecitase™**

Todos los experimentos en relación con el desgomado de aceite comestible se realizaron como se describe en el ejemplo 10.

Aceite:

Aceite de semilla de colza desgomado con agua (Colzro) de Aarhus Oliefabrik,
35 Dinamarca.

Lote C00730/B01200, 9 kg, contenido de P 186 partes por millón (0,47% fosfátido).

El aceite no es un producto disponible comercialmente, pero se ha cogido directamente de la línea de producción de la fábrica.

Enzima:

Lecitase™ 10L

- 5 Lote L646-F02 (10190 U/ml), conc. estimada 20 mg/ml.

Las condiciones específicas para una serie de experimentos de optimización del parámetro con Lecitase™ se presentan en la tabla 9. Las condiciones estándar son: dosificación enzimática 535 U/kg aceite (1,1 mg/kg aceite), 60 °C, 2,0 eq. NaOH (pH 5,5). La dosificación enzimática ha sido variada de 268-1070 U/kg aceite, la temperatura ha sido variada de 40-70°C y la adición de NaOH ha sido variada de 1,0-3,0 eq. correspondiente a los diferentes niveles de pH que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones específicas para la optimización de Lecitase™

Experimento #	Aceite de semilla de colza	Temp. (°C)	Eq. NaOH	Nivel de pH*	Dosificación de enzimas (U/kg aceite)
10	Colzro 1200	60°C	2,0	5,5	0 (vacío)
21	Colzro 1208	60°C	0,0	3,7	0 (vacío)
8	Colzro 1200	60°C	2,0	5,5	535
9	Colzro 1200	60°C	2,0	5,5	535
11	Colzro 1200	60°C	2,0	5,5	268
12	Colzro 1200	60°C	2,0	5,5	1070
15	Colzro 1200	70°C	2,0	5,5	535
17	Colzro 1200	50°C	2,0	5,5	535
18	Colzro 1200	40°C	2,0	5,5	535
19	Colzro 1200	60°C	1,0	4,5	535
40	Colzro 1209	60°C	1,5	5,0	535
44	Colzro 1429	60°C	2,5	7,0	535
20	Colzro 1200	60°C	3,0	8,0	535

- *pH de t = 35 min. - 6 horas. Dentro de este período de tiempo todas las determinaciones del pH estaban dentro de un margen limitado. Este hecho se ilustra en el ejemplo 13 posterior.

En la tabla 10 se ofrecen las presentaciones de los estudios de optimización separados.

- Los resultados en la tabla 10 muestran que,
- 20 i) de la investigación dosis/reacción puede observarse que la dosis de la enzima óptima (a 60°C y 2,0 eq. NaOH) es de aproximadamente 535 U/kg aceite. La mitad de la dosificación aumenta el tiempo del desgomado de aproximadamente 3,5 a 6 horas y la dosificación doble no aporta ningún cambio en el rendimiento del desgomado. Se insertaron los resultados enzimáticos en blanco para
- 25 comparar;

- ii) que la adición óptima NaOH es aproximadamente de 2,0 eq. (pH a aproximadamente 5,5), con un rendimiento pobre a 1,0 eq. (pH a aproximadamente 4,5) y 3,0 eq. (pH a aproximadamente 8);
- iii) que la temperatura óptima es aproximadamente de 60°C, ya que 70°C no hace bajar totalmente el nivel de P, 50°C aumenta el tiempo del desgomado de aproximadamente 3,5 a 6 horas y 40°C proporciona un rendimiento pobre.

Tabla 10: Resultados de optimización de las condiciones de desgomado de Lecitase™

Ex #	Tiempo ¹ 0	Tiempo ¹ 0,50	Tiempo ¹ 0,58	Tiempo ¹ 1,0	Tiempo ¹ 2,0	Tiempo ¹ 3,5	Tiempo ¹ 5,0	Tiempo ¹ 6,0
10	160	140	116	118	108	109	105	109
21	178	149	-	143	142	143	147	154
8	164	139	117	85	30	-	2	3
9	164	136	109	79	14	4	3	4
11	183	149	123	104	78	35	10	7
12	165	131	117	71	13	3	4	3
15	170	139	127	83	23	10	11	9
17	162	134	127	95	56	15	11	5
18	176	151	136	100	66	28	24	28
19	171	139	147	142	142	118	91	80
40	184	149	157	126	109	73	40	30
44	226	202	197	148	99	66	40	34
20	165	136	111	102	90	81	73	72

¹Contenido de fósforo (partes por millón) en la fase de aceite según el tiempo indicado en horas.

Ejemplo 12

Condiciones óptimas del desgomado para una fosfolipasa *Fusarium oxysporum* según la invención

- El desgomado enzimático de todos los experimentos con el aceite comestible se realizó como se describe en el ejemplo 10.

Aceite:

Aceite de semilla de colza desgomado con agua (Colzro) de Aarhus Oliefabrik, Dinamarca.

- Lote C00730/B01208, contenido de P aproximadamente 200 partes por millón
 Lote C00730/B01209, contenido de P aproximadamente 200 partes por millón
 Lote C00730/B01429, contenido de P 227 partes por millón
 Lote C00730/B01430, contenido de P 252 partes por millón

Los aceites no están comercialmente disponibles, pero se han cogido directamente de la línea de producción de la fábrica.

Enzima:

PL de *Fusarium oxysporum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia no 2.

Lote F-9700123, OD₂₈₀ 1,48; pureza ca. 58%, conc. estimada 0,9 mg/ml.

- 5 La enzima fue expresada recombinantemente y purificada en el modo descrito anteriormente.

Las condiciones específicas para una serie de experimentos de optimización del parámetro con PL de *Fusarium oxysporum* se presentan en la tabla 11. Las condiciones estándar son: dosificación enzimática 1,6 mg/kg aceite, 40°C, 1,5 eq. NaOH (pH aproximadamente 5,0). La dosificación enzimática ha sido variada de 0,2-1,6 mg/kg de aceite, la temperatura ha sido variada de 30-50°C y la adición de NaOH ha sido variada de 1,0-2,5 eq. correspondiente a los diferentes niveles de pH que se muestran en la tabla 11.

15 Tabla 11. Condiciones específicas para la optimización de PL de *Fusarium oxysporum*.

Experimento #	Semilla de aceite de colza	Temp. (°C)	Eq. NaOH	nivel de pH	Dosificación enzimática (mg/kg. aceite)
31	Colzro 1208	40°C	1,5	5,0	1,6
53	Colzro 1429	40°C	1,5	5,3	1,6
33	Colzro 1209	40°C	1,5	5,0	0,8
35	Colzro 1209	40°C	1,5	5,0	0,4
36	Colzro 1209	40°C	1,5	5,0	0,2
38	Colzro 1209	50°C	1,5	5,0	1,6
64	Colzro 1430	45°C	1,5	5,0	1,6
39	Colzro 1209	30°C	1,5	5,0	1,6
32	Colzro 1209	40°C	1,0	3,5	1,6
13	Colzro 1200	40°C	1,0	4,5	1,6
45	Colzro 1429	40°C	1,25	5,0	1,6
46	Colzro 1429	40°C	1,75	5,5	1,6
34	Colzro 1209	40°C	2,0	5,5	1,6
37	Colzro 1209	40°C	2,5	6,2	1,6

Los resultados experimentales se presentan en la tabla 12 posterior. Las desviaciones de pH en el margen de tiempo de 35 min. - 6 horas se encuentran dentro de los intervalos esperados, con sólo irregularidades menores.

- 20 En resumen, los resultados de la tabla 12 posterior muestran que,
- de las pruebas dosis/reacción puede observarse que la dosis de enzimas óptimas (a 40°C y 1,5 eq. NaOH) es aproximadamente 0,8 mg/kg de aceite;
 - la adición óptima NaOH es aproximadamente 1,5 eq. (pH aproximadamente 5,0), sin rendimiento a 1,0 eq. (pH aproximadamente 4,5) y con rendimiento limitado a 2,0 eq. (pH aproximadamente 5,5) y 2,5 eq. (pH aproximadamente 6,2); y
- 25

- iii) la temperatura óptima es alrededor de 45°C, y 50°C proporciona un rendimiento limitado.

5 Tabla 12: Resultados de la optimización de las condiciones del desgomado de *Fusarium oxysporum*

Ex #	Tiempo ¹ 0	Tiempo ¹ 0,50	Tiempo ¹ 0,58	Tiempo ¹ 1,0	Tiempo ¹ 2,0	Tiempo ¹ 3,5	Tiempo ¹ 5,0	Tiempo ¹ 6,0
31	169	130	136	15	8	7	8	7
53	232	203	208	32	10	7	7	4
33	188	156	160	27	7	6	6	8
35	181	153	153	78	5	5	4	6
36	187	162	157	117	61	32	20	15
38	187	149	146	84	83	68	58	55
64	252	192	201	10	4	4	4	4
39	184	163	158	36	7	7	9	9
32	167	137	165	152	146	151	148	146
13	170	140	141	140	133	126	130	131
45	221	189	195	161	118	99	92	95
46	225	187	163	93	4	7	6	15
34	189	174	165	61	27	25	26	19
37	205	168	157	88	22	23	20	21

¹Contenido de fósforo (partes por millón) en fase de aceite según el tiempo indicado en horas.

Ejemplo 13

- 10 Ilustración de las desviaciones estándar del pH durante un proceso de desgomado enzimático

La tabla 13 posterior muestra un ejemplo medio de las desviaciones del pH durante el proceso de desgomado enzimático realizado como se describe en el ejemplo 10.

- 15 Los experimentos son realizados con Lecitase™. Véase ejemplo 11 para más detalles.

Tabla 13: Valores de pH de t = 35 min. - 6 horas.

Tiempo (horas)	pH Ex. #8 (2,0 q.)	pH Ex. #15 (2,0 q.)	pH Ex. #19 (1,0 q.)	pH Ex. #20 (3,0 q.)
0,58	4,97	5,80	4,45	7,38
1,0	5,82	5,75	4,46	7,63
2,0	5,50	5,44	4,57	8,13
3,5	5,35	5,34	-	8,37
5,0	5,25	5,47	4,47	8,21
6,0	5,01	5,26	4,43	8,05

Si no se mencionan adicionalmente en los ejemplos de los experimentos de desgomado enzimático descritos aquí, las desviaciones estándar del pH, en dichos experimentos, resultaron como se muestran en la tabla 13 anterior.

5 Ejemplo 14

Comparación de la capacidad del desgomado enzimático de Lecitase™ y una fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* según la invención.

En la figura 2, se muestran los resultados del PL según sus condiciones óptimas respectivas, determinados en los ejemplos 11 y 12 anteriores.

10 Las condiciones experimentales mostradas en la figura 2:

Lecitase™: 60°C, pH 5,5 (2,0 eq. NaOH) y 1 mg enzima/kg de aceite (aproximadamente 535 U) (exp. # 9).

PL de *Fusarium oxysporum*: 40 °C, pH 5,0 (1,5 eq. NaOH) y 0,8 mg enzima/kg de aceite (exp. # 33).

15 PL de *Fusarium oxysporum*: 45 °C, pH 5,0 (1,5 eq. NaOH) y 1,6 mg enzima/kg de aceite (exp. # 64).

Aparentemente, el PL de *Fusarium oxysporum* proporciona un efecto muy rápido del desgomado en comparación con Lecitase™.

20 El PL de *Fusarium*, según la invención, proporciona un desgomado casi total después de aproximadamente 25 minutos de contacto con la enzima al aceite.

Ejemplo 15

Determinación de la cantidad de fosfolípidos no hidratables presente en diferentes tipos de aceites comestibles

25 Aceites:

-Aceite de semilla de colza crudo de Århus Oliefabrik (AOM), Dinamarca.

Lote C00745/B01146, contenido de P 609 partes por millón. Este lote contiene residuos sólidos.

-Aceite de semilla de colza crudo de Scanola, (Dinamarca)

30 Lote C00745/B01593, contenido de P 315 partes por millón.

-Aceite de semilla de colza crudo filtrado

Lote C00745/B01146 filtrado, contenido de P 231 partes por millón.

Este aceite es el lote C00745/B01146 anterior (609 partes por millón) filtrado a través de un filtro Johnson de 100µm.

35 -Aceite de semilla de colza crudo de Århus Oliefabrik (AOM), Dinamarca.

Lote C00745/B01700, contenido de P 459 partes por millón.

-Aceite de semilla de colza de Lurgi, Alemania

Lote C00932/B01381, contenido de P 148 partes por millón.

-Aceite de soja crudo de Arhus Oliefabrik, Dinamarca.

Lote C00744/B01145, contenido de P 593 partes por millón

5 La determinación de la cantidad de fosfolípidos no hidratables presente en los diferentes tipos de aceites comestibles mostrados anteriormente se realizó mediante el pretratamiento de los aceites con una solución que incluye monohidrato de ácido cítrico en agua, tal como se describe en el ejemplo 10 anterior.

Brevemente, el proceso del pretratamiento incluye,

- 10 i) tratamiento previo del aceite comestible, a 60°C, mediante la adición de una solución que incluye monohidrato de ácido cítrico en agua (agua añadida vs. aceite equivale a 4,8% peso/peso; [ácido cítrico] en fase acuosa = 106 mM, en emulsión de agua/aceite = 4,6 mM) durante 30 minutos;
- ii) transferencia de 10 ml de agua tratada previamente en una emulsión de aceite a un tubo;
- 15 iii) calentamiento de la emulsión al baño maría durante 30 minutos;
- iv) centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos,
- v) transferencia de aproximadamente 8 ml de la fase superior (de aceite) a un tubo nuevo y reposo durante 24 horas;

20 Tras el reposo, coger 2 g de fase clara superior para la medición del contenido de fósforo no hidratable (partes por millón) en el aceite comestible. El valor ppm fue determinado como se describe en el ejemplo 10 anterior.

Después de este proceso, la cantidad de fosfolípidos no hidratables presente en los diferentes tipos de aceites comestibles mostrados anteriormente fue,

25 el aceite de semilla de colza crudo #1146 de AOM contiene materia sólida granulosa, la cual es parcialmente responsable del alto nivel de P (609 ppm); la filtración a través de un tamiz Johnson de 100 µm produjo un aceite claro con un contenido de P de 231 partes por millón.

30 El pretratamiento del aceite crudo y del aceite filtrado produjo un nivel de P de 140 partes por millón, que es una medida de los fosfolípidos no hidratables presente en el aceite;

el contenido de fosfolípidos de un aceite de semilla de colza crudo de Scanola se redujo de 315 partes por millón a aproximadamente 30 partes por millón mediante el pretratamiento;

35 el contenido de fosfolípidos de una semilla de aceite de colza obtenido de Lurgi (probablemente mezcla arbitraria de aceite crudo y aceite totalmente refinado) se redujo a 60 partes por millón mediante el proceso de pretratamiento;

el pretratamiento de aceite de semilla de colza crudo #1710 de AOM redujo el contenido de P de 459 a 200-250 partes por millón;

con aceite de soja crudo #1145 de AOM, el pretratamiento redujo el nivel de P de 593 a 10 partes por millón. Este aceite de soja constituye un ejemplo de aceites que pueden ser desgomados sólo mediante el desgomado con el tratamiento de citrato/agua. La adición enzimática a este aceite de soja crudo después del pretratamiento no redujo más el contenido de P.

Estos datos muestran que la composición de fosfolípidos (fosfolípido hidratable vs. fosfolípido no hidratable) del aceite de semilla de colza crudo varía inmensamente de un lote para otro y, consecuentemente, el nivel de fosfolípidos restante en el aceite de semilla de colza desgomado con agua variará en un amplio margen (30 partes por millón (Scanola) a 200-250 partes por millón (AOM)).

Para el desgomado enzimático, la dosificación de enzimas óptimas depende de la cantidad de fosfolípidos no hidratables presente después del desgomado o pretratamiento.

Además, cuanto más alta es la cantidad de fosfolípidos no hidratables presente en el aceite, más útil es el método del desgomado enzimático.

Este hecho se ilustra también en el ejemplo 16 posterior, donde la presente invención muestra el desgomado enzimático del aceite de semilla de colza crudo #1146, el cual tiene un nivel de fosfolípidos no hidratables de alrededor 140 partes por millón.

Ejemplo 16

El desgomado del aceite comestible de semilla de colza crudo (I)

Los experimentos A y B fueron realizados según el "Procedimiento general para realizar el desgomado enzimático" como se describe en el ejemplo 10 anterior.

Aceite:

Aceite de semilla de colza crudo de Århus Oliefabrik (AOM), Dinamarca.

Lote C00745/B01146, contenido de P 609 partes por millón. Este lote contiene residuos sólidos.

30 Enzima:

Lecitase™ 10L

Lote L646-F02 (10190 U/ml), conc. estimada 20 mg/ml

PL de *Fusarium oxysporum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia No. 2.

35 Lote F-9700123, OD₂₈₀ 1,48, pureza ca. 58%, conc. estimada 0,9 mg/ml.

La enzima fue expresada recombinantemente y purificada en el modo descrito anteriormente.

Experimento A (referencia)

Se agregan 0,6 l (580 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 60°C. Cuando t = 30 minutos, se agregan 1,43 ml (5,7 mmoles) de solución 4 M NaOH, produciendo un pH de aproximadamente 5,6. Cuando t = 35 minutos, se agregan 30 µl (300 Unidad) de Lecitase 10L (obtenida de Novo Nordisk A/S). El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado, así como los valores de pH en la fase acuosa, se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados del desgomado de aceite de semilla de colza crudo con Lecitase™.

Tiempo (horas)	Contenido de fósforo en la fase de aceite	pH
0	609	
0,50	155	
0,58	146	4,8
1,0	127	5,6
2,0	88	5,6
3,5	61	5,7
5,0	44	5,7
6,0	34	5,6
		5,8

Experimento B

Se agregan 0,6 l (581 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 40°C. Cuando t = 30 minutos, se añaden 1,07 ml (4,3 mmoles) de solución 4 M NaOH, produciendo un pH de aproximadamente 5,4. Cuando t = 35 minutos, se añaden 1 ml (0,9 Mg) de una solución purificada (ejemplo 2) de la fosfolipasa *F. oxysporum*. El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado, así como los valores de pH en la fase acuosa, se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del desgomado de aceite de semilla de colza crudo con fosfolipasa *F. oxysporum*.

Tiempo (horas)	Contenido de fósforo en la fase de aceite	pH
0	609	
0,50	155	
0,58	149	4,9
1,0	91	5,4
2,0	13	5,3
3,5	11	5,4
5,0	13	5,3
6,0	10	5,4
		5,2

Ejemplo 17**Desgomado del aceite comestible de semilla de colza cruda (II)**

Los experimentos A y B fueron realizados según el "Procedimiento general para realizar el desgomado enzimático" como se describe en el ejemplo 10 anterior.

Aceite:

Aceite de semilla de colza crudo de Århus Oliefabrik (AOM), Dinamarca.

Lote C00745/B01710, contenido de P 459 partes por millón.

Enzima:

5 Lecitase™ 10L

Lote L646-F02 (10190 U/ml), conc. estimada 20 mg/ml

PL de *Fusarium oxysporum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia No. 2.

Lote F-9700476, OD₂₈₀ 0,8, pureza ca. 58%, conc. estimada 0,45 mg/ml.

- 10 La enzima fue expresada recombinantemente y purificada en el modo descrito anteriormente.

Experimento A

Se agregan 0,6 l (580 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 60°C. Cuando t = 30 minutos, se agregan 1,43 ml (5,7 mmoles) de solución de 4 M

- 15 NaOH, produciendo un pH de aproximadamente 5,6. Cuando t = 35 minutos, se añade una cantidad apropiada (p. ej. 50 µl (alrededor de 500 unidades) por 1 mg enzima/kg aceite) de Lecitase 10L (obtenida de Novo Nordisk A/S). El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado se muestra en la tabla 16.

- 20 Tabla 16. Resultados del desgomado de aceite de semilla de colza crudo con Lecitase.

Tiempo (horas)	1 mg Lecitase/ kg aceite P(ppm)	2 mg Lecitase/ kg aceite P(ppm)	3 mg Lecitase/ kg aceite P(ppm)
0	459	459	459
0,50	251	235	248
0,58	202	194	202
1,0	181	186	183
2,0	165	156	107
3,5	111	66	11
5,0	52	12	12
6,0	20	5	9

Experimento B

Se agregan 0,6 l (581 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 40°C. Cuando t = 30 minutos, se agregan 1,07 ml (4,3 mmoles) de solución 4 M NaOH,

- 25 produciendo un pH de aproximadamente 5,0. Cuando t = 35 minutos, se añaden una cantidad apropiada (es decir 1,6 mg enzima/kg aceite, y 3,2 mg enzima/kg aceite) de una solución purificada de la fosfolipasa de *F. oxysporum*. El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado se presenta en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados del desgomado de aceite de semilla de colza crudo con fosfolipasa de *F. oxysporum*.

Tiempo (horas)	1,6 mg <i>Fusarium</i> /kg aceite P(ppm)	3,2 mg <i>Fusarium</i> /kg aceite P(ppm)
0	459	459
0,50	236	208
0,58	193	173
1,0	109	96
2,0	9	7
3,5	9	8
5,0	9	9
6,0	9	9

En resumen los resultados muestran,

5 Lecitase, 60°C, pH 5,5

La dosificación enzimática varió de 1,0 a 3,0 mg/kg aceite. Los resultados se presentan en la tabla 16 anterior. En una dosificación enzimática de 1,0 mg/kg, el desgomado de aceite fue lento y produjo aproximadamente 20 partes por millón tras 6 horas. Con dosificaciones enzimáticas elevadas, el rendimiento del desgomado mejoró para producir un contenido de fósforo de 10 partes por millón después de aproximadamente 3,5 horas con 3,0 mg enzima/kg aceite.

Se asume que el rendimiento mejorará adicionalmente si se emplean dosificaciones más elevadas de enzima.

F. oxysporum PL, 45°C, pH 5,0

15 Se evaluaron las dosificaciones enzimáticas 1,6 y 3,2 mg/kg aceite, y el rendimiento resultó ser igualmente bueno (tabla 17 anterior). Con 1,6 mg de enzima/kg aceite -o posiblemente inferior- se observó un desgomado excelente produciendo 9 partes por millón de P después de aproximadamente 2 horas. Se incluye la posibilidad de usar cantidades todavía más inferiores de la fosfolipasa *F. oxysporum* (p. ej. 0,9 mg/kg
20 aceite) y conseguir todavía un buen rendimiento del desgomado.

Ejemplo 18

Desgomado de aceite comestible desgomado con agua usando una preparación de fosfolipasa obtenida de *Fusarium culmorum*

25 Un experimento según el "Procedimiento general para realizar un desgomado enzimático" se realizó como se describe en el ejemplo 10 anterior.

Aceite:

Aceite de semilla de colza desgomado con agua de Århus Oliefabrik (AOM), Dinamarca.
Lote C00730/B01700, contenido de P 231 partes por millón.

Enzima:

Un caldo de fermentación de *Fusarium culmorum*.

Una cepa de *Fusarium culmorum* fue cultivada, centrifugada y el sobrenadante purificado como se describe a continuación.

- 5 Se produjeron cultivos de semilla de la cepa de *Fusarium culmorum* CBS 513,94 (fecha de depósito 25 de octubre de 1994) en frascos de agitación de 500 ml con 100 ml de la composición siguiente:

Licor de maíz impregnado (seco) 12 g/l

Glucosa 24 g/l

- 10 A cada frasco se añaden 0,5 g de CaCO_3 y 0,5 ml de aceite.

El pH se ajusta a 5,5 antes de la esterilización en autoclave.

Después de 3 días a 26°C y 250 rpm, se inocularon 5 ml de cada uno de los cultivos de la semilla en frascos de agitación con 100ml del siguiente medio:

Peptona, Difco 0118 6 g/l

- 15 Pepticasa, Sheffield Products 4 g/l

Extracto de levadura, Difco 0127 3 g/l

Extracto de carne, Difco 0126 1,5 g/l

Dextrosa, Roquette 101-0441 1 g/l

Aceite de oliva, Sigma 10 g/l

- 20 El pH se ajusta a 7,3-7,4 antes de la esterilización en autoclave.

El cultivo tuvo lugar durante 9 días a 26°C y 250 rpm. Los caldos fueron centrifugados y filtrados (0,45 μm), los sobrenadantes recogidos y aplicados para el experimento del desgomado que se muestra a continuación.

Actividad estimada 200 PHLU/ml.

25

Experimento: Desgomado enzimático de un aceite desgomado con agua usando una preparación de fosfolipasa obtenida de *Fusarium culmorum*

- 30 Se agregan 0,6 l (581 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 40°C. Cuando $t = 30$ minutos, se agregan 1,43 ml (5,7 mmoles) de solución de 4 M NaOH, produciendo un pH de aproximadamente 5,5. Cuando $t = 35$ minutos, se añade una cantidad apropiada (es decir 1070 PHLU/kg aceite) de una solución purificada de fosfolipasa *F. culmorum*. El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados del desgomado de aceite de semilla de colza crudo con fosfolipasa de *F. culmorum*.

Tiempo (horas)	1070 U <i>F. culmorum</i> /kg aceite P(ppm)
0	254
0,50	-
0,58	213
1,0	137
2,0	61
3,5	9
5,0	8
6,0	7

Ejemplo 19

5 Desgomado enzimático de aceite crudo usando Degomma VOD

Aceite

Aceite de semilla de colza crudo C00745/B01700, contenido de P 459 partes por millón

Enzima

Una fosfolipasa disponible comercialmente Degomma VOD (Röhm; Alemania), conc. est.

10 10 mg/ml.

Se agregan 0,6 l (581 g) de aceite de semilla de colza crudo en el equipo y se calientan a 50°C. Cuando t = 30 minutos, se añaden 0,714 ml (2,86 mmoles) de solución 4 M NaOH, produciendo un pH de aproximadamente 4,5. Cuando t = 35 minutos, se añade una cantidad apropiada (es decir 3,6 mg/kg aceite, o 7,1 mg/kg aceite) de una solución purificada de fosfolipasa Degomma VOD. El contenido de fósforo medido en la fase de aceite tras el centrifugado se muestra en la tabla 19.

15

Tabla 19

Tiempo	3,6 mg/kg aceite	7,1 mg/kg aceite
0	276	273
0,50	216	253
0,58	210	246
1,0	127	94
2,0	45	16
3,5	15	7
5,0	15	10
6,0	14	10

20

Este ejemplo ilustra que Degomma VOD es capaz de desgomar un aceite comestible. No obstante, con el objetivo de obtener un desgomado satisfactorio de dicho aceite, se requieren dosis relativamente altas de Degomma VOD en comparación con la fosfolipasa *Fusarium* de la invención. Véase p. ej. los ejemplos 16 y 17 para comparar.

Ejemplo 20

Uso de una fosfolipasa obtenida de *F. oxysporum* como agente para mejorar el pan.

Materiales y métodos**5 Preparación del pan**

Pan blanco y panecillos de masa tipo europea fueron preparados a partir de la siguiente receta básica:

Receta básica

	Harina (Meneba BBZ)	100 % (2000g)
10	Agua	61 %
	Levadura	4 %
	Sal	1,5 %
	Azúcar	1,5%
	Ácido ascórbico	40 partes por millón
15	Procedimiento de cocción	
	Mezcla (mezclador espiral), 625 rpm	3 minutos
	Mezcla (mezclador espiral), 1250 rpm	3,5 minutos
	Evaluación de la masa	7 minutos
	Fermentación (temperatura ambiente)	15 minutos
20	Colocación en bandeja/moldeado	3 minutos
	Reposo a temperatura ambiente	5 minutos
	Mezcla	2 minutos
	Reposo a temperatura ambiente	5 minutos
	Colocación en bandeja/moldeado/colocación en molde	2 minutos
25	Tratamiento (32°C, 82% RH)	
	Panecillos:	45 minutos
	Pan en molde:	55 minutos
	Cocción (230°C)	
	Panecillos:	22 minutos
	Pan en molde:	35 minutos

30 Evaluación de la masa y los productos horneados

Las propiedades de la masa y los productos horneados se determinaron de la siguiente manera:

Índice de volumen específico:

- El volumen de una barra de pan o panecillo se mide mediante el método tradicional de desplazamiento de la semilla de colza. El volumen específico se calcula como ml de volumen por g de pan. El volumen específico del control (sin enzima) se define como 100. El índice de volumen específico relativo se calcula como:

$$\text{Índice de volumen específico} = \frac{\text{volumen específico de la barra de pan}}{\text{volumen específico de la barra de pan de control}} \times 100$$

- 5 La pegajosidad de la masa se evalúa según la escala siguiente:

Condición del panecillo	muy plano	1
	plano	2
	normal	3
	bueno/redondo	4
10	buenísimo	5
	demasiado redondo	6

Resultados

Tabla 20

Enzima/aditivo								
Lecimultin 100*(g/kg harina)					1	1	1	1
Fosfolipasa F.o.(LU/kg harina)		500	1500	3000		500	1500	3000
Índice de volumen específico (panecillos)	100	110	106	93	99	111	116	108
Índice de volumen específico (pan en molde)	100	106	99	94	102	107	109	103
Condición del panecillo (resultado)	3	4	4	3	3	4	5	4,5

* preparación comercial de lecitina para la cocción (Superfos, Dinamarca).

- 15 Los resultados muestran un efecto claro que aumenta el volumen de la fosfolipasa *Fusarium oxysporum* en los panecillos y en el pan colocado en el molde, en la receta que no contiene lecitina. Si se incluye lecitina en la receta, se obtienen efectos de volumen todavía mejores, aunque la lecitina en sí no contribuye a aumentar el volumen. Un análisis estadístico (ANOVA, (=0,05), realizado en Statgrafics Plus, liberación 3,0,
- 20 muestra una sinergia positiva significativa entre fosfolipasa y lecitina.

Tanto con como sin lecitina en la receta, se obtiene una forma significativamente mejorada de los panecillos (condición del panecillo) con fosfolipasa *F. oxysporum*. En este ejemplo, la mejor condición del panecillo se obtuvo mediante la combinación de lecitina y fosfolipasa (1500 LU/kg harina).

25

Ejemplo 21

Uso de una fosfolipasa obtenida de *F. oxysporum* como agente contra el endurecimiento del pan

Materiales y métodos

- 30 Preparación del pan

Pan blanco y panecillos con masa tipo europea fueron preparados a partir de la siguiente receta básica:

Receta básica

	Harina (Meneba BBZ)	100 % (2000g)
5	Agua	61 %
	Levadura	5 %
	Sal	1,5%
	Azúcar	1,5%
	Ácido ascórbico	40 partes por millón
10	Procedimiento de cocción	
	Mezcla (mezclador espiral), 625 rpm	3 minutos
	Mezcla (mezclador espiral), 1250 rpm	3,5 minutos
	Evaluación de la masa	7 minutos
	Fermentación (temperatura ambiente)	15 minutos
15	Colocación en bandeja / moldeado	3 minutos
	Reposo a temperatura ambiente	5 minutos
	Mezcla	2 minutos
	Reposo a temperatura ambiente	5 minutos
	Colocación en bandeja/moldeado/colocación en molde	2 minutos
20	Tratamiento (32°C, 82% RH)	55 minutos
	Cocción (230°C)	35 minutos

En este ejemplo, las barras de pan fueron colocadas en moldes con tapa con el objetivo de evitar diferencias en los volúmenes específicos antes del análisis de textura.

Después del enfriamiento, las barras fueron almacenadas a temperatura ambiente y

25 embaladas en bolsas de plástico.

Evaluación de los productos horneados

La evaluación de la dureza y textura del pan puede realizarse según el método AACC 74-09. La evaluación de la blandura de las migas de pan como indicadores de la

30 dureza del pan se realizó 0, 1, 3, y 7 días después de la cocción, según el siguiente procedimiento:

Una rebanada de pan fue comprimida a velocidad constante en un analizador de textura (TA TX-2) y la fuerza para compresión fue medida en g. La solidez de la miga se mide como la fuerza a una compresión del 25%. La solidez de una miga de pan aumenta

35 a medida que el pan se vuelve duro.

Resultados

Los resultados de las medidas de la solidez como función de los días del almacenamiento se muestran en la tabla 2. Se añadió Lecimultina en una concentración de 1 g/kg de harina y se añadió fosfolipasa *Fusarium oxysporum* en una dosificación de 500 U/kg de harina. Cada figura en la tabla es el valor medio de 6 medidas (2 barras de pan, 3 medidas en cada una).

Tabla 21

Enzima/aditivo	Solidez Día 0	Solidez Día 1	Solidez Día 3	Solidez Día 7
Control	223	350	631	1061
Lecimultina 100*	225	261	532	1010
Fosfolipasa	201	303	573	1257
Lecimultina 100* + Fosfolipasa	169	304	468	834

* Preparación de lecitina comercial para la cocción (Superfos, Dinamarca).

10 Como se muestra en la tabla 21, el pan tratado con fosfolipasa era ligeramente más blando que el control hasta 3 días de almacenamiento. En combinación con lecitina, podría obtenerse un significativo efecto contra el endurecimiento del pan a través del almacenamiento completo (no puede obtenerse sólo con lecitina o fosfolipasa).

Lista de secuencias

La secuencia ID No. 1 muestra una secuencia clonada de ADN de la invención, incluyendo una secuencia de ADN que codifica una enzima que presenta actividad fosfolipasa.

5

(2) Información para la secuencia ID no: 1:

(i) Características de la secuencia:

(A) Longitud: 1170 pares de bases

(B) Tipo: ácido nucleico

10

(C) Cadena: única

(D) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc

(vi) Fuente original:

(A) Organismo: *Fusarium oxysporum*

15

(B) Cepa: DSM 2672

(ix) Característica:

(A) Nombre/clave: CDS

(B) Posición: 23..1063

(xi) Descripción de la secuencia: secuencia ID no: 1:

20

TTGGAGAATA TTCCTTGTC A CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG GCC ATC 52
Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile
1 5 10

25

ACC CTC GCG GTA GCC AGT CCT GTA GCT CTC GAC GAC TAC GTC AAC TCT 100
Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser
15 20 25

30

CTT GAG GAG CGA GCT GTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC AGC AAC TTC 148
Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe
30 35 40

35

AAG TTC TAC ATC CAA CAC GGC GCC GCA GCT TAC TGC AAC TCT GAA GCC 196
Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala
45 50 55

40

GCA GCT GGT TCC AAG ATC ACC TGC TCC AAC AAT GGC TGT CCA ACC GTT 244
Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val
60 65 70

	CAG GGC AAC GGA GCG ACC ATC GTG ACA TCT TTC GTT GGC TCC AAG ACA Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr 75 80 85 90	292
5	GGT ATC GGT GGC TAC GTC GCG ACA GAC TCT GCC CGA AAG GAA ATC GTC Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val 95 100 105	340
10	GTC TCG TTC CGC GGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TGG CTT ACC AAC CTC Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu 110 115 120	388
15	GAC TTC GGC CAG GAA GAC TGC AGT CTC GTC TCT GGA TGC GGT GTG CAC Asp Phe Gly Gln Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His 125 130 135	436
20	TCT GGC TTC CAG CGA GCC TGG AAT GAG ATC TCG TCT CAA GCA ACC GCT Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala 140 145 150	484
	GCT GTT GCC TCC GCC CGC AAG GCG AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser 155 160 165 170	532
25	ACA GGC CAC TCC CTT GGA GGT GCC GTG GCC GTT CTT GCT GCC GCA AAC Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn 175 180 185	580
30	TTG AGA GTC GGT GGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GGC TCT CCC Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro 190 195 200	628
35	CGT GTC GGA AAC GCG CAG CTC TCA GCC TTC GTC TCA AAC CAG GCT GGT Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly 205 210 215	676
40	GGA GAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro 220 225 230	724
	CCT CTG ATC TTC GGA TAC AGG CAC ACA ACT CCT GAG TTC TGG CTG TCC Pro Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser 235 240 245 250	772

	GGC GGT GGA GGC GAC AAG GTT GAC TAC ACC ATC AGC GAT GTC AAG GTC	820
	Gly Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val	
	255 260 265	
5	TGT GAG GGT GCT GCC AAC CTT GGA TGC AAC GGT GGA ACT CTT GGT TTG	868
	Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu	
	270 275 280	
10	GAT ATT GCT GCT CAT CTG CAT TAC TTC CAG GCG ACT GAC GCC TGT AAC	916
	Asp Ile Ala Ala His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn	
	285 290 295	
	GCT GGT GGC TTC TCT TGG CGA CGA TAC AGA AGC GCC GAG AGC GTC GAC	964
15	Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp	
	300 305 310	
	AAG AGG GCC ACC ATG ACT GAT GCC GAG CTT GAG AAG AAG CTG AAC TCT	1012
	Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser	
20	315 320 325 330	
	TAT GTC CAG ATG GAT AAG GAG TAT GTG AAG AAT AAC CAG GCC CGC TCT	1060
	Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser	
	335 340 345	
25	TAA CGAGGGTATG AGGTTTGATG GGAAATGACA TGATTCATGA ACGAAACCAT	1113
	*	
	AGTACATATG ATGCAAATAG GATATAAAAA CATATTTCAT TCACTAGCTT TACACAA	1170
30		

La secuencia ID No. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una fosfolipasa de la invención

(2) Información para la secuencia ID No: 2:

35 (i) Características de la secuencia:

(A) Longitud: 346 aminoácidos

(B) Tipo: aminoácido

(D) Topología: linear

(ii) Tipo de molécula: proteína

40 (xi) Descripción de la secuencia: secuencia ID No: 2:

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
 5 20 25 30
 Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45
 10 Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
 50 55 60
 Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 15 Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95
 Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
 20 100 105 110
 Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
 115 120 125
 25 Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140
 Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 30 Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly
 165 170 175
 Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr
 35 180 185 190
 Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln
 195 200 205

Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr
 210 215 220

His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr
 5 225 230 235 240

Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Lys
 245 250 255

10 Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn
 260 265 270

Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu
 275 280 285

15 His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp
 290 295 300

Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr
 20 305 310 315 320

Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys
 325 330 335

25 Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser *
 340 345

Reivindicaciones

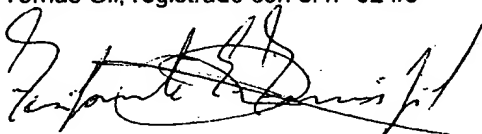
1. Polipéptido que presenta actividad fosfolipasa A seleccionado del grupo consistente en:
 - a) un polipéptido codificado por la parte que codifica fosfolipasa A de la secuencia de ADN clonada en plásmido pYES 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
 - b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en las posiciones 31-346 de la secuencia ID no 2;
 - c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la posición 31-303 de la secuencia ID no 2; y
 - d) un polipéptido que es homólogo al menos en un 70 % con dicho polipéptido definido en (a), (b) o (c).
2. Polipéptido de la reivindicación 1, el cual es una fosfolipasa A1.
3. Polinucleótido que incluye una secuencia seleccionada del grupo consistente en:
 - a) la secuencia que codifica la fosfolipasa A clonada en plásmido pYES 2,0 presente en *Escherichia coli* DSM 11299;
 - b) nucleótidos 23-1063 de la secuencia ID No:1;
 - c) nucleótidos 113-1063 de la secuencia ID No:1;
 - d) nucleótidos 113-931 de la secuencia ID No:1;
 - e) aminoácidos que codifican un polinucleótido 31-346 de la secuencia ID no 2;
 - f) aminoácidos que codifican un polinucleótido 31-303 de la secuencia ID no 2; y
 - g) un polinucleótido que es homólogo al menos en un 70 % con cualquiera de los polinucleótidos precedentes, donde dicho polinucleótido codifica un polipéptido que presenta actividad fosfolipasa A.
4. Polinucleótido de la reivindicación 3, el cual codifica un polipéptido de fosfolipasa A1.
5. Vector que incluye el polinucleótido de la reivindicación 3 o 4.
6. Célula huésped que incluye el vector de la reivindicación 5.
7. Célula huésped de la reivindicación 6, la cual es una célula eucariótica, en particular una célula fúngica como una célula fúngica filamentosa, p. ej. *Aspergillus* o *Fusarium*.
8. Método para la producción de fosfolipasa A, el cual comprende
 - a) cultivo de la célula huésped de la reivindicación 6 o 7 bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha fosfolipasa y
 - b) recuperación de la fosfolipasa.
9. Uso del polipéptido de la reivindicación 1 o 2 en un proceso que incluye el tratamiento de un fosfolípido o lisofosfolípido con fosfolipasa para hidrolizar grupos acilos grasos.
10. Uso del polipéptido de la reivindicación 1 o 2 en un proceso para reducir el contenido de fosfolípidos en un aceite comestible que tiene un contenido de fósforo de 50-250 partes por millón, incluyendo el tratamiento de aceite con el polipéptido para hidrolizar

una parte importante del fosfolípido y la separación de una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite.

11. Uso del polipéptido de la reivindicación 1 o 2 en un proceso para hacer un producto horneado, el cual comprende la adición del polipéptido a una masa y la cocción de la masa para hacer el producto horneado.

DILIGENCIA: La presente traducción al español del texto inglés del fascículo de Patente Europea número 97610056.0 Publicado con el nº EP 869167 concedida con designación de España ha sido realizada para dar cumplimiento a lo establecido en el Decreto 2424/1986 del 10 de Octubre, con la intervención del Agente de la Propiedad Industrial acreditado ante el Registro español.

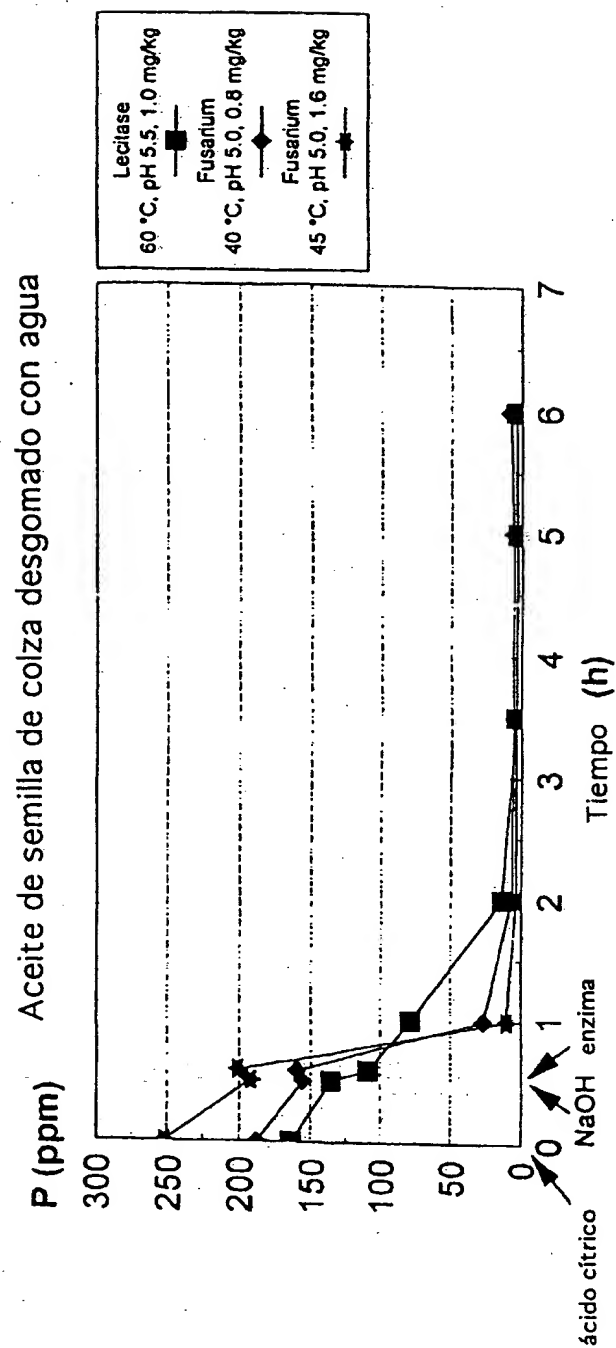
- 15 Tesifonte Enrique Tomás Gil, registrado con el nº 824/9



F.oxysporum	1	-ML	L	L	P	L	L	S	A	I	T	L	A	V	A	S	P	V	A	-	L	D	D	Y	V	N	S	L	E	E	R	A	31			
F.heterosporum	1	MML	V	L	S	L	L	S	I	.	A	F	T	A	A	G	P	V	P	S	V	D	E	N	T	R	V	L	E	H	R	A	33			
F.oxysporum	32	V	G	V	T	T	T	D	F	S	N	F	K	F	Y	I	Q	H	G	A	A	A	Y	C	N	S	E	A	A	G	S	K	I	64		
F.heterosporum	34	V	T	V	T	T	Q	D	L	S	N	F	R	F	Y	L	Q	H	A	D	A	A	Y	C	N	F	N	T	A	V	G	K	P	V	66	
F.oxysporum	65	T	C	S	N	N	G	C	P	T	V	Q	G	N	G	A	T	I	V	T	S	F	V	G	S	K	T	G	I	G	Y	V	A	97		
F.heterosporum	67	H	C	S	A	G	N	C	P	D	I	E	K	D	A	A	I	V	V	G	S	V	V	G	T	K	T	G	I	G	A	Y	V	A	99	
F.oxysporum	98	T	D	S	A	R	K	E	I	V	V	S	F	R	G	S	I	N	I	R	N	W	L	T	N	L	D	F	G	Q	E	D	C	S	130	
F.heterosporum	100	T	D	N	A	R	K	E	I	V	V	S	V	R	G	S	I	N	V	R	N	W	I	T	N	F	N	F	G	Q	K	T	C	D	132	
F.oxysporum	131	L	V	S	G	C	G	V	H	S	G	F	Q	R	A	W	N	E	I	S	S	Q	A	T	A	A	V	A	S	A	R	K	A	N	163	
F.heterosporum	133	L	V	A	G	C	G	V	H	T	G	F	L	D	A	W	E	E	V	A	A	N	V	K	A	A	V	S	A	A	K	T	A	N	165	
F.oxysporum	164	P	S	F	N	V	I	S	T	G	H	S	L	G	G	A	V	A	V	L	A	A	A	N	L	R	V	G	G	T	P	V	D	I	198	
F.heterosporum	166	P	T	F	K	F	V	V	T	G	H	S	L	G	G	A	V	A	T	I	A	A	A	Y	L	R	K	D	G	F	P	F	D	L	198	
F.oxysporum	197	Y	T	Y	G	S	P	R	V	G	N	A	Q	L	S	A	F	V	S	N	Q	A	G	G	E	Y	R	V	T	H	A	D	O	P	229	
F.heterosporum	199	Y	T	Y	G	S	P	R	V	G	N	D	F	F	A	N	F	V	T	Q	Q	T	G	A	E	Y	R	V	T	H	G	D	D	P	231	
F.oxysporum	230	V	P	R	L	P	P	L	I	F	G	Y	R	H	T	T	P	E	F	W	L	S	G	G	G	G	D	K	V	D	Y	T	I	S	262	
F.heterosporum	232	V	P	R	L	P	P	I	V	F	G	Y	R	H	T	S	P	E	Y	W	L	N	G	G	P	L	D	K	-	D	Y	T	V	T	263	
F.oxysporum	263	D	V	K	V	C	E	G	A	A	N	L	G	C	N	G	G	T	L	G	L	D	I	A	A	H	L	H	Y	F	Q	A	T	D	295	
F.heterosporum	264	E	I	K	V	C	E	G	I	A	N	V	M	C	N	G	G	T	I	G	L	D	I	L	A	H	I	T	Y	F	Q	S	M	A	296	
F.oxysporum	296	A	C	N	A	G	G	F	S	W	R	R	I	Y	R	S	A	E	S	V	D	K	R	A	T	M	T	D	A	E	L	E	K	K	L	328
F.heterosporum	297	T	C	A	P	I	A	I	P	W	K	R	318	
F.oxysporum	329	N	S	Y	V	Q	M	D	K	E	Y	V	K	N	N	Q	A	R	S	346	
F.heterosporum	319	T	Q	Y	S	E	M	D	Q	E	F	V	K	Q	M	I	333	

Fig. 1

Fig. 2 Desgomado de aceite - *Fusarium* PL vs. Lecitase



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.